



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

DISTRIBUCIÓN DE CIANOBACTERIAS SIMBIÓTICAS UNICELULARES UCYN-A
FIJADORAS DE NITRÓGENO EN UN TRANSECTO FRENTE AL PUERTO DE MAZATLÁN,
LOCALIZADO EN LA ZONA DE MÍNIMO OXÍGENO DEL PACÍFICO MEXICANO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
CAMPO DE CONOCIMIENTO: BIOLOGÍA MARINA, ECOLOGÍA MICROBIANA

PRESENTA:

CINTHYA VIEYRA MEXICANO

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. SILVIA PAJARES MORENO
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNAM-CU)

COMITÉ TUTOR:

DRA. ANA ELENA ESCALANTE HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, (UNAM)

DRA. VALERIA SOUZA SALDIVAR
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, (UNAM)

DR. MARTÍN MERINO IBARRA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, (UNAM)

DR. ERIK CORIA MONTER
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, (UNAM)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MAYO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



DISTRIBUCIÓN DE CIANOBACTERIAS SIMBIÓTICAS UNICELULARES UCYN-A
FIJADORAS DE NITRÓGENO EN UN TRANSECTO FRENTE AL PUERTO DE MAZATLÁN,
LOCALIZADO EN LA ZONA DE MÍNIMO OXÍGENO DEL PACÍFICO MEXICANO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
CAMPO DE CONOCIMIENTO: BIOLOGÍA MARINA, ECOLOGÍA MICROBIANA

PRESENTA:
CINTHYA VIEYRA MEXICANO

TUTORA PRINCIPAL:
DRA. SILVIA PAJARES MORENO
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNAM-CU)

COMITÉ TUTOR:
DRA. ANA ELENA ESCALANTE HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, (UNAM)

DRA. VALERIA SOUZA SALDIVAR
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, (UNAM)

DR. MARTÍN MERINO IBARRA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, (UNAM)

DR. ERIK CORIA MONTER
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, (UNAM)

MÉXICO, CD. MX., MAYO, 2022

Agradecimientos académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICML) y al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

A la Dra. Silvia Pajares Moreno por haberme brindado la oportunidad de desarrollar este proyecto y por haberme adentrado en esta línea de investigación que me apasionó tanto, pero sobre todo por su paciencia, asesoría y guía durante este proceso.

A la Dra. Valeria Souza Saldivar, a la Dra. Ana Elena Escalante Hernández, al Dr. Erik Coria Monter y al Dr. Martín Merino Ibarra por su participación en el comité tutorial, por sus sugerencias, por abrirme el panorama y darme otro punto de vista relacionado con sus áreas.

Agradecimientos adicionales a la Dra. Valeria Souza por su apoyo para poder llevar a cabo el proceso de secuenciación en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO, CINVESTAV). También al Dr. Martín Merino Ibarra y al Tec. Hidrobiólogo Castillo Sandoval Fermín, del laboratorio de Biogeoquímica Acuática (ICML), por proporcionarme los datos de nutrientes. Al M. en C. Arturo Ronquillo Arvizu, del laboratorio de Instrumentación Oceanográfica, por la ayuda en el procesamiento de los datos del CTD.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado con número de beca 1044593 durante el desarrollo de esta tesis de Maestría en el Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología.

A los proyectos PAPIIT-UNAM No. IA201617 y Ciencia de Frontera No. CF-2019-2266 del CONACYT, cuya responsable técnica es la Dra. Silvia Pajares, por los recursos otorgados para la realización de esta tesis.

De nuevo agradecimientos a la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo para poder llevar a cabo las campañas oceanográficas MAZ IV y MAZ V. De la misma manera, agradezco a la tripulación del B/O “El Puma” por su apoyo y atenciones durante los muestreos.

A José Antonio, a Sandra, a Viridiana y a Mercedes por su apoyo durante los muestreos.

Por sus enseñanzas y asesoría en bioinformática a Jazmín Sánchez Pérez.

Por su tan valiosa asesoría en los análisis bioinformáticos a la Dra. Kendra Turk-Kubo del Departamento de Ciencias Oceánicas, Universidad de California (USA).

A la unidad de Posgrado, UNAM, por el apoyo económico para la participación en el XXI Congreso Nacional de Oceanografía y III Reunión Internacional de Ciencias Marinas (Apoyos financieros PAEP, 2021).

Agradecimientos personales

Por su cariño, sus consejos y por soportarme tanto, agradezco a mi familia.

A mi madre Veronica Mexicano Guevara por todo su apoyo y por creer tanto en mí.

A mi hermano Luis Jesús Vieyra Mexicano por ponerme los pies en la tierra y darme el valor para continuar.

A Jesús Enrique Sánchez García quien siempre ha creído en mí, quien me ha alentado e impulsado a seguir adelante, y con quien he crecido para ser una mejor persona.

Por su amistad, consejos y apoyo dentro y fuera del laboratorio a:

Ramiro Ramos de la Cruz

José Antonio Hernández Hernández

María del Carmen Zárate Pelayo

Pero especialmente, agradezco y dedico este trabajo con todo mi cariño a mi abuelo Jesús Mexicano Pérez por brindarme su apoyo incondicional.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES.....	3
2.1	Fijación biológica de N ₂	3
2.2	Fijación biológica de N ₂ en sistemas marinos	10
2.3	Diversidad y distribución de fijadores de N ₂ en sistemas marinos	13
2.4	Factores que afectan a la fijación de N ₂ en sistemas marinos.....	20
2.5	Zonas de mínimo oxígeno.....	22
3.	JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA	25
4.	PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	25
5.	HIPÓTESIS	25
6.	OBJETIVOS.....	26
6.1	Objetivo general.....	26
6.2	Objetivos específicos:	26
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
7.1	Área de estudio y estrategia de muestreo.....	27
7.2	Toma de muestras	28
7.3	Parámetros hidrográficos y químicos.....	28
7.4	Análisis moleculares	29
7.5	Análisis bioinformáticos	30
7.6	Asignación taxonómica.....	30
7.7	Análisis filogenético	31
7.8	Análisis de datos y estadísticos.....	32
8.	RESULTADOS	33
8.1	Variables oceanográficas y nutrientes en los cruceros MAZ IV y MAZ V	33
a)	<i>Condiciones climáticas</i>	33
b)	<i>Características de las masas de agua</i>	34
c)	<i>Características hidrográficas</i>	37
d)	<i>Características bioquímicas del agua</i>	39
8.2	Distribución y diversidad de UCYN-A en los cruceros MAZ IV y MAZ V	41
a)	<i>Construcción de las bibliotecas del gen nifH y obtención de ASVs</i>	41
b)	<i>Asignación taxonómica y filogenia del gen nifH de UCYN-A</i>	42
c)	<i>Análisis de diversidad alfa de la comunidad UCYN-A</i>	47

d) Análisis de diversidad beta: Relaciones de las variables ambientales y los nutrientes con la distribución de la comunidad UCYN-A.....	51
e) Distribución de las ASVs más abundantes de la comunidad UCYN-A.....	53
f) ASVs compartidas y únicas entre las muestras superficiales de todas las estaciones del crucero MAZ IV y las profundidades de muestreo de la zona costera para los cruceros MAZ IV y MAZ V.....	56
9. DISCUSIÓN.....	58
9.1 Condiciones oceanográficas de la ZMO frente al Puerto de Mazatlán.....	58
9.2 Composición y diversidad espacio-temporal del clado UCYN-A.....	60
9.3 Factores oceanográficos que controlan la distribución de UCYN-A en el Pacífico central mexicano.....	64
9.4 Presencia de UCYN-A en la ZMO del Pacífico mexicano.....	66
10. CONCLUSIONES.....	68
11. LITERATURA CITADA.....	70
12. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	79

FIGURAS Y TABLAS

2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Fijación biológica de N ₂	3
Figura 1. Proteína nitrogenasa MoFe de <i>Azotobacter vinelandii</i>	3
Tabla 1. Primers diseñados para la amplificación del gen <i>nifH</i> en muestras provenientes de la columna de agua utilizados en diversos estudios oceanográficos.....	6
2.2 Fijación biológica de N ₂ en sistemas marinos.....	10
Tabla 2. Estimaciones de las tasas anuales de FBN en diferentes sistemas marinos.....	11
Tabla 3. Estimaciones de tasas diarias de FBN en diferentes sistemas marinos.....	13
2.3 Diversidad y distribución de fijadores de N ₂ en sistemas marinos.....	13
Tabla 4. Estudios oceanográficos representativos de UCYN-A.....	18
2.5 Zonas de mínimo oxígeno.....	22
Figura 2. Mapa de las principales ZMO.....	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
7.1 Área de estudio y estrategia de muestreo.....	27
Figura 3. Mapa de la localización del transecto, de una zona costera a una oceánica en frente del Puerto de Mazatlán.....	27
8. RESULTADOS.....	33
8.1 Variables oceanográficas y nutrientes en los cruceros MAZ IV y MAZ V.....	33
Figura 4. Evolución temporal de los eventos El Niño y La Niña indicados por el MEI.v2.....	34

Figura 5. Diagramas T-S.....	36
Figura 6. Secciones verticales de los parámetros hidrográficos cruceros MAZ IV y MAZ V	38
Figura 7. Secciones verticales de la concentración de los nutrientes cruceros MAZ IV y MAZ V..	40
8.2 Distribución y diversidad de UCYN-A en los cruceros MAZ IV y MAZ V	41
Figura 8. Abundancia relativa de los sublinajes UCYN-A presentes en las 11 muestras.....	43
Figura 9. Árbol filogenético de los 50 ASVs representantes más abundantes de UCYN-A.....	46
Figura 10. Índice de Chao1.	48
Figura 11. Análisis de diversidad alfa con los índices de Shannon-Weaver y Simpson	49
Figura 12. Análisis de diversidad filogenética con el índice de Faith.	49
Figura 13. Diagramas de caja y bigote de diferentes índices de diversidad alfa por profundidad de muestreo para cada crucero	50
Figura 14. Gráfica de ordenación del RDA.....	52
Figura 15. Mapa de calor con la distribución de la abundancia relativa de los 50 ASVs más abundantes representativos de los 13 oligotipos de UCYN-A.....	55
Figura 16. Diagrama de Venn-Euler de las ASVs compartidos entre las profundidades de muestreo de la estación costera del crucero MAZ IV.....	57
Figura 17. Diagrama de Venn-Euler de las ASVs compartidos entre las profundidades de muestreo de la estación costera del crucero MAZ V.....	57
12. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	79
Figura S1. Número de lecturas obtenidas por muestra en la secuenciación por Illumina	79
Figura S2. Abundancia relativa del gen <i>nifH</i> UCYN-A del total de las secuencias asignadas a distintos oligotipos del gen <i>nifH</i> -UCYN-A en las 11 muestras.	80
Figura S3. Árbol filogenético de los 50 ASVs representantes más abundantes de UCYN-A	81
Figura S4. Curvas de rarefacción de las ASVs obtenidas en función de las secuencias.....	82
Figura S5. Comparación de la diversidad alfa de las muestras de la estación costera por profundidad en cada crucero para los diferentes índices calculados.....	83
Figura S6. Gráfica NMDS basada en la matriz de distancia de Bray-Curtis.	84
Figura S7. Diagrama de Venn-Euler de las ASVs compartidas entre las muestras superficiales de las estaciones de muestreo del crucero MAZ IV.	85
Tabla S1. Muestras amplificadas y secuenciadas de ambos cruceros	86
Tabla S2. Resultados de las pruebas ANOSIM	87

RESUMEN

La disponibilidad de nitrógeno (N) limita la productividad biológica en vastas regiones del océano debido a que se encuentra como gas dinitrógeno atmosférico (N_2), no disponible para la mayoría de los organismos. Sin embargo, un grupo de procariotas llamados diazótrofos son capaces de fijar el gas N_2 en amonio (NH_4^+) biológicamente disponible, proporcionando una fuente importante de N para las comunidades microbianas y las redes alimentarias. En los últimos años, se ha dado a conocer a un grupo de cianobacterias simbióticas unicelulares, llamadas UCYN-A, como uno de los fijadores de N_2 más abundantes y ampliamente distribuidos en el océano global. Estas cianobacterias se han encontrado en diversos ecosistemas marinos, con excepción de las zonas de mínimo oxígeno (ZMO), que se han propuesto como un ambiente ideal para la diazotrofia marina, pero hasta el momento sólo se ha reportado la presencia de bacterias heterótrofas y de UCYN-B. Este trabajo estudia la diversidad y composición de este clado de cianobacterias fijadoras de N_2 , así como su relación con las variables oceanográficas en un transecto frente al puerto de Mazatlán, en plena ZMO del Pacífico Nortropical Oriental (ETNP por sus siglas en inglés), en dos campañas oceanográficas, realizadas ambas en la temporada de primavera. Se tomaron muestras de agua a diferentes profundidades en un transecto en los años 2018 (cuatro estaciones) y 2019 (cinco estaciones). El gen *nifH* se amplificó y se evaluó por secuenciación masiva. Se encontró una mayor diversidad del gen *nifH* de UCYN-A en 2018 (crucero MAZ IV), particularmente en la muestra de fondo hipóxico de la estación costera, en comparación con el 2019 (crucero MAZ V). Estas diferencias se atribuyen principalmente a la presencia de eventos de surgencia y fenómenos ENSO, que tuvieron gran influencia en las características hidrográficas y bioquímicas en esta región y que indujeron diferencias temporales en la distribución del clado UCYN-A en ambos cruceros. Se determinó la presencia de 13 oligotipos pertenecientes a los sublinajes UCYN-A1 (un oligotipo), que se distribuyó principalmente en la zona eufótica de las estaciones oceánicas del crucero MAZ IV, y UCYN-A2 (12 oligotipos) que tuvo una amplia distribución a lo largo del transecto en ambos cruceros, respondiendo a diferentes condiciones hidrográficas y de nutrientes. Por último, esta investigación demuestra por primera vez la presencia del sublinaje UCYN-A2 en una ZMO, el cual se encontró en el fondo hipóxico de la estación costera del crucero MAZ IV.

SUMMARY

The availability of nitrogen (N) limits biological productivity in vast regions of the ocean because it is found as atmospheric dinitrogen gas (N₂), unavailable to most organisms. However, a group of prokaryotes called diazotrophs are capable of fixing N₂ gas into biologically available ammonium (NH₄⁺), providing an important source of N for microbial communities and food webs. In recent years, a group of unicellular symbiotic cyanobacteria called UCYN-A has become known as one of the most abundant and widely distributed N₂ fixers in the global ocean. These cyanobacteria have been found in various marine ecosystems, except for oxygen minimum zones (OMZ), which have been proposed as an ideal environment for marine diazotrophy, but so far only heterotrophic bacteria have been reported. This research studies the diversity and composition of this clade of N₂-fixing cyanobacteria, as well as their relationship with oceanographic variables present in a transect off the port of Mazatlán, in the OMZ of the Eastern North Tropical Pacific (ETNP), in two oceanographic campaigns in the same spring season. Water samples were collected at different depths along a transect in 2018 (four sampling stations) and 2019 (five sampling stations). The *nifH* gene was amplified and evaluated by high-throughput sequencing. Higher diversity of UCYN-A *nifH* gene was found in 2018 (MAZ cruise IV), particularly in the hypoxic bottom sample from the coastal station, in contrast to 2019 (MAZ cruise V). These differences are mainly attributed to the presence of upwelling events and ENSO phenomena, which had great influence on the hydrographic and biochemical characteristics found in this region and induced temporal differences in the distribution of the UCYN-A clade in both cruises. The presence of 13 oligotypes were determined belonging to the sublineages UCYN-A1 (one oligotype), which was mainly distributed in the euphotic layer of the oceanic stations of MAZ IV campaign, and UCYN-A2 (12 oligotypes), which showed a wide distribution along the transect in both campaigns, responding to different hydrographic and nutrient conditions. Finally, this research demonstrates for the first time the presence of the UCYN-A2 sublineage in an OMZ, which was found at the hypoxic bottom of the coastal station of the MAZ IV cruise.

1. INTRODUCCIÓN

El N es un elemento fundamental para todas las formas de vida, siendo parte de las estructuras de los ácidos nucleicos y aminoácidos. Además, es un nutriente esencial para la productividad marina. En el océano está presente en diferentes formas y estados de oxidación, entre las que destacan el N_2 , una molécula muy estable que requiere sistemas enzimáticos especializados para romperse y poder utilizarse; el nitrato (NO_3^-), la forma más oxidada; el NH_4^+ , la forma más reducida; el N orgánico particulado, predominante en sedimentos, y el N orgánico disuelto, una mezcla compleja de compuestos nitrogenados (Brandes *et al.*, 2007; Gruber, 2008; Singh *et al.*, 2012).

El ciclo del N marino es quizás el más complejo y, por lo tanto, el más fascinante entre todos los ciclos biogeoquímicos. Ocupa un papel central en la biogeoquímica oceánica, ejerciendo una influencia significativa en los ciclos de otros elementos, particularmente oxígeno (O_2), carbono (C) y fósforo (P). La disponibilidad de N regula la bomba biológica de C, uno de los mecanismos que contribuyen a la absorción oceánica de dióxido de carbono atmosférico y su hundimiento hacia el fondo de los océanos (Falkowski, 1997). El ciclo del N es impulsado por una serie de transformaciones y reacciones complejas de oxidación-reducción mediadas por microorganismos, que incluyen procesos clásicos como la fijación biológica de N_2 (FBN), la asimilación, la nitrificación, la desnitrificación, la reducción desasimilatoria de NO_3^- a NH_4^+ (DNRA), y nuevos procesos como la oxidación anaerobia del NH_4^+ (anammox) y la oxidación anaerobia del metano dependiente de NO_3^- /nitrito (NO_2^-) (N-damo) (Pajares y Ramos, 2019). Todos estos procesos son realizados por microorganismos marinos como parte de su metabolismo, ya sea para obtener N para sintetizar componentes estructurales o para obtener energía para el crecimiento (Vitousek y Howarth, 1991).

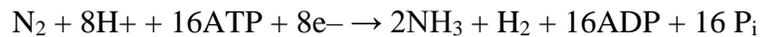
Las principales fuentes de N para el océano son la FBN y la deposición atmosférica, mientras que los principales sumideros son la desnitrificación y el anammox (Damashek y Francis, 2018; Pajares y Ramos, 2019). Si la pérdida de N biodisponible no fuera compensada, la productividad del océano decrecería rápidamente. Por lo tanto, la FBN tiene un papel crítico al proporcionar la mayor entrada externa de N al océano (Gruber, 2016; Ahmed *et al.*, 2017). La FBN es catalizada por la nitrogenasa y llevada a cabo por un grupo diverso pero limitado de bacterias y arqueas conocidas como diazótrofos. Por medio de técnicas moleculares

basadas en la amplificación del gen *nifH* de la enzima nitrogenasa, ahora se conoce que ciertas cianobacterias y bacterias heterótrofas marinas fijan N_2 en diversos ambientes y son más abundantes de lo que se pensaba (Moisander *et al.*, 2010; Farnelid *et al.*, 2013). Asimismo, en los últimos años se ha encontrado que las cianobacterias simbióticas unicelulares marinas, conocidas como UCYN-A, son un componente clave de la comunidad diazotrófica global, mostrando tasas de FBN relativamente altas en la superficie oceánica (Cabello *et al.*, 2016; Martínez-Pérez *et al.*, 2016; Cornejo-Castillo, 2017). Por otro lado, estudios recientes de las distribuciones de los microorganismos portadores del gen *nifH* han demostrado la presencia de este grupo de diazótrofos en diversos entornos marinos (Thompson *et al.*, 2014; Cabello *et al.*, 2016, 2020; Turk-Kubo *et al.*, 2017), con excepción de las ZMO, las cuales se han propuesto como un ambiente ideal para la diazotrofia marina, encontrándose principalmente la presencia de diazótrofos heterótrofos (Bopp *et al.*, 2002). Las ZMO son regiones oceánicas con concentraciones extremadamente bajas de O_2 ($\leq 20 \mu M$) (Smethie, 1987; Paulmier y Ruiz-Pino, 2009). Las ZMO tienen un profundo impacto en el balance de N oceánico, representando alrededor del 30-50% de la pérdida de N marino (Codispoti *et al.*, 2001). En la actualidad, estas ZMO se encuentran en expansión debido al calentamiento global y a las actividades antropogénicas, lo que contribuye a la desoxigenación del océano global e implica que más volúmenes oceánicos se sometan a mayores pérdidas de N (Lam *et al.*, 2009; Ulloa *et al.*, 2012). El entendimiento del ciclo del N es complejo en las ZMO debido a las múltiples transformaciones microbianas que ocurren y a la complejidad del propio hábitat (Lam y Kuypers, 2011). Hasta la fecha poco se sabe sobre los diazótrofos UCYN-A en las ZMO, en particular, la que se localiza en el ETNP, la cual representa una de las ZMO más extensas e intensas del océano global.

2. ANTECEDENTES

2.1 Fijación biológica de N₂

La FBN es el proceso por el cual bacterias y arqueas de diversas fisiologías (incluidos anaerobios, aerobios facultativos, aerobios y fotótrofos), conocidas como diazótrofes, reducen el gas N₂ en dos moléculas de amoníaco (Sohm *et al.*, 2011b) de acuerdo a la siguiente reacción:



Esta reacción es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa (Figura 1), que es extremadamente sensible al O₂. La enzima nitrogenasa está compuesta por dos metaloproteínas de múltiples subunidades. El componente I está compuesto por la dinitrogenasa (que contiene hierro –Fe– y molibdeno –Mo–), codificada por los genes *nifD* y *nifK*, y el componente II está compuesto por la dinitrogenasa reductasa (que contiene Fe), codificada por el gen *nifH* (Zehr y McReynolds, 1989). También se conocen varias nitrogenasas alternativas que contienen una tercera subunidad que reemplaza el Mo con vanadio (V) o solamente contiene Fe en el componente I, y está codificada por los genes *vnfH* y *anfH*, respectivamente (Fallik *et al.*, 1991).

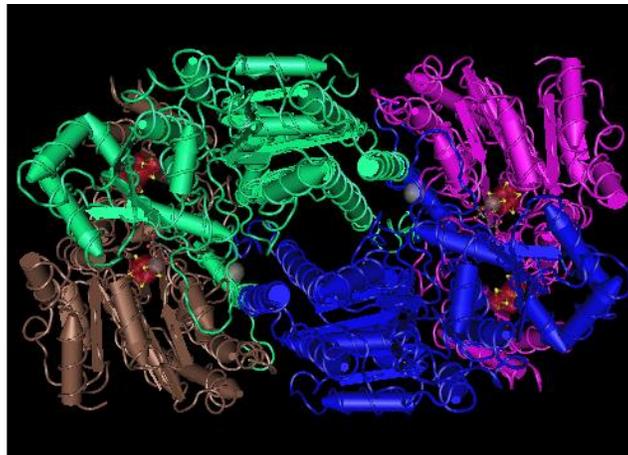


Figura 1. Proteína nitrogenasa MoFe de *Azotobacter vinelandii*. Tomada de NCBI MMDB (Einsle *et al.*, 2002).

En las últimas décadas, el espectro de organismos reconocidos que contribuyen a la FBN en el océano se ha ampliado considerablemente gracias a los métodos moleculares, en particular, a la amplificación del gen *nifH*, un gen marcador altamente conservado usado comúnmente para estudios de abundancia y diversidad de diazótrofos (Zehr *et al.*, 2003).

Las secuencias del gen *nifH* amplificadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cambiaron el conocimiento de la diversidad de los diazótrofos y, al mismo tiempo, proporcionaron un medio práctico para clasificar e identificar microorganismos diazótrofos no cultivados, para los cuales se ha diseñado una gran cantidad de primers (Tabla 1). Zehr y McReynolds (1989) fueron los primeros en diseñar un par de primers degenerados para abarcar la variabilidad de secuencias del gen *nifH*. Años más tarde, Zani *et al.* (2000) diseñaron un segundo par de primers degenerados. Hasta la fecha, estos pares de primers se han convertido en los más usados, empleados en una PCR anidada para una variedad de estudios enfocados en el gen *nifH*. Sin embargo, no se han dejado de realizar numerosos esfuerzos para diseñar nuevos conjuntos de primers *nifH* universales y específicos de los diferentes grupos de genes de la nitrogenasa (Gaby y Buckley, 2012). De la misma manera, se han llevado a cabo otros métodos, como análisis metagenómicos y técnicas de visualización microscópicas (ej. hibridación *in situ* de fluorescencia de deposición de reportero doble catalizado (CARD-FISH)), que han permitido revelar diversos filotipos de *nifH* no amplificados con primers (Cornejo-Castillo, 2017; Tang *et al.*, 2020).

Los análisis filogenéticos de las secuencias de genes *nifH* han revelado cinco grupos primarios de genes homólogos a *nifH*. El grupo I consiste en el *nifH* convencional que contiene Fe-Mo y *vnfH*, y está presente en fijadores aeróbicos de N₂, como Proteobacterias, Cianobacterias (*Trichodesmium*, UCYN-A, *Crocospaera* -UCYN-B- y *Cyanothece* -UCYN-C-) y Firmicutes (*Frankia* y *Paenibacillus*). En su mayoría contiene secuencias obtenidas por clonación y secuenciación de diferentes estudios marinos. De hecho, este grupo contiene a la mayor parte de la diversidad de diazótrofos marinos conocidos hasta la fecha. El grupo II está formado por la agrupación de nitrogenasas alternativas con los cofactores de Fe-Fe y Fe-V, y está presente en algunas arqueas. El grupo III consiste en fijadores anaeróbicos de N₂ que incluyen bacterias y arqueas como *Desulfovibrionaceae*, *Clostridia*, *Spirochataes* y *Methanobacteria*. Los grupos IV y V contienen secuencias que son parálogos

de *nifH* y que no están involucradas en la FBN (Gaby y Buckley, 2012; Thompson y Zehr, 2013).

Tabla 1. Primers diseñados para la amplificación del gen *nifH* en muestras provenientes de la columna de agua utilizados en diversos estudios oceanográficos.

Primers	Sitio de estudio	Grupos	Método de estudio	Referencias
<i>nifH3</i> (ATR TTR TTN GCN GCR TA) / <i>nifH4</i> (TTY TAY GGN AAR GGN GG); <i>nifH1</i> (TGY GAY CCN AAR GCN GA) / <i>nifH2</i> (ADN GCC ATC ATY TCN CC)	Mar Caribe occidental	Cianobacterias unicelulares y filamentosas, Alfa y Gamma Proteobacterias	Librería de clonas	(Zehr y McReynolds, 1989)
	Océano Atlántico Norte	Cianobacterias unicelulares y filamentosas, Bacterias heterótrofas	Librería de clonas	(Langlois <i>et al.</i> , 2005)
	Océano Atlántico Norte	Cianobacterias unicelulares (UCYN-A, -B y -C) y filamentosas	Librería de clonas	(Foster <i>et al.</i> , 2007)
	ETSP, ZMO	Cianobacterias unicelulares y filamentosas, Alfa, Beta y Gamma Proteobacterias	Librería de clonas	(Fernandez <i>et al.</i> , 2011)
	Océano Atlántico Norte	Cianobacterias unicelulares (UCYN-A y -B) y filamentosas, Gamma Proteobacterias	Librería de clonas Y qPCR	(Turk-Kubo <i>et al.</i> , 2011)
	Mar Árabe, ZMO	Cianobacterias unicelulares y filamentosas, Alfa, Beta y Gamma Proteobacterias	Librería de clonas	(Jayakumar <i>et al.</i> , 2012)
	Golfo de Spencer, Australia del Sur	Cianobacterias unicelulares (UCYN-A1, -A2 y -A3), Alfa y Gamma Proteobacterias	Pirosecuenciación	(Messer <i>et al.</i> , 2015)
	Mar del Norte y el Gran Cinturón	Cianobacterias unicelulares (UCYN-A) y filamentosas, Gamma Proteobacterias	Secuenciación Illumina y qPCR	(Bentzon-Tilia <i>et al.</i> , 2015)
	NPSG, ESP y PNW	UCYN-A, Alfa, Beta y Gamma Proteobacterias	Secuenciación Illumina y qPCR	(Gradoville <i>et al.</i> , 2017)
	Océano Pacífico y Mar de Bering	Cianobacterias unicelulares (UCYN-A1, -A2 y -A3; UCYN-C) y filamentosas, Gamma Proteobacterias	Secuenciación Illumina y qPCR	(Shiozaki <i>et al.</i> , 2017)
	Noroeste de España, Océano Atlántico Norte	Cianobacterias unicelulares (UCYN-A1, -A2 y -A4) y Gamma Proteobacterias	Secuenciación Illumina	(Moreira-Coello <i>et al.</i> , 2019)

	Océano Pacífico Norte	Cianobacterias unicelulares (UCYN-A1, -A2, -A3 y -A4), Alfa, Beta, Gamma y Delta Proteobacterias	Secuenciación Illumina	(Cabello <i>et al.</i> , 2020)
	Océano Atlántico Norte	Cianobacterias unicelulares (UCYN-A1 y -A2) y filamentosas.	Secuenciación Illumina	(Tang <i>et al.</i> , 2020)
	Océano Pacífico Norte (SCCS)	Cianobacterias unicelulares (UCYN-A1, -A2, -A3 y -A4) y filamentosas, Alfa, Beta, Gamma y Delta Proteobacterias, Grupo III	Secuenciación Illumina	(Turk-Kubo <i>et al.</i> , 2021)
	Mar Mediterráneo	Cianobacterias unicelulares (UCYN-A1, -A2, -A3 y -A4), Gamma y Delta Proteobacterias	Secuenciación Illumina	(Ridame <i>et al.</i> , 2022)
<i>nifH3</i> (ATR TTR TTN GCN GCR TA) / <i>nifH4</i> (TTY TAY GGN AAR GGN GG); <i>nifH1</i> (TGY GAY CCN AAR GCN GA) / <i>nifH2-Zani</i> (AND GCC ATC ATY TCN CC)	Lago meso-oligotrófico, Nueva York, USA	Cianobacterias unicelulares y filamentosas, Alfa, Beta y Gamma Proteobacterias	Librería de clonas	(Zani <i>et al.</i> , 2000)
	Mar del Coral, Australia	Cianobacterias, Proteobacterias y arqueas	Librería de clonas y qPCR	(Hewson <i>et al.</i> , 2007)
	Giro oceánico, Pacífico Sur	Cianobacterias unicelulares (UCYN-A), Gamma Proteobacterias, Grupo III (<i>Desulfobacter</i> , <i>Desulfovibrio</i>)	Librería de clonas y qPCR	(Halm <i>et al.</i> , 2012)
<i>F1</i> (TAYGGIAARGGIGGIATYGGIAARTC); <i>F2</i> (TGYGAYCCIAAIGCIGA) / <i>R6</i> (TCIGGIGARATGATGGC); <i>R6-2018</i> (GCC ATC ATY TCI CCI GA)	Mar Rojo	Bacterias heterótrofas y Cianobacterias	qPCR	(Pogoreutz <i>et al.</i> , 2017)
	El Gran Cinturón y el fiordo de Roskilde, Dinamarca	Cianobacterias y Proteobacterias	Secuenciación Illumina	(Angel <i>et al.</i> , 2018)
<i>F</i> (GGHAARGG HGGHATHGGNAARTC) / <i>R</i> (GGCATNGCRAANCCVCCRCA NAC)	Océano Pacífico Norte	Alfa, Beta y Gamma Proteobacterias, Arqueas	Librería de clonas	(Mehta <i>et al.</i> , 2003)
<i>UMBforw</i> (CACAATAATGGAGATGGCTGCAC) / <i>UMBrev</i> (CAAATCCGCCACAAACCACATCA)	Mar Árabe, ZMO	Proteobacterias	Librería de clonas	(Bird <i>et al.</i> , 2005)

<i>nif32-F</i> (TGAGACAGATAGCTATYTAYGGHAA) / <i>nif623-R</i> (GATGTTTCGC GCGGCACGAADTRNATSA); <i>nifH1</i> (TGY GAY CCN AAR GCN GA) / <i>nifH2</i> (AND GCC ATC ATY TCN CC)	Océano Pacífico Norte	Cianobacterias unicelulares (UCYN- A y -B) y filamentosas, Gamma Proteobacterias	Librería de clonas Y qPCR	(Steward <i>et al.</i> , 2004; Church, 2005a; Church <i>et al.</i> , 2005b)
<i>CNF</i> (CGT AGG TTG CGA CCC TAA GGC TGA) / <i>CNR</i> (GCA TAC ATC GCC ATC ATT TCA CC)	Mar Árabe, ZMO	Cianobacterias unicelulares	Librería de clonas	(Mazard <i>et al.</i> , 2004)
Grupo A F- (AGCTATAACAACGTTTTATGCGTTGA) / R- (ACCACGACCAGCACATCCA)	Océano Pacífico Norte; Océano Atlántico Norte y Sur	Cianobacterias unicelulares (UCYN- A, -B y -C) y filamentosas, Gamma Proteobacterias	qPCR	(Church <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Sohm <i>et al.</i> , 2011a; Luo <i>et al.</i> , 2012; Cabello <i>et al.</i> , 2020; Tang <i>et al.</i> , 2020)
Grupo B F-(TGGTCCTGAGCCTGGAGTTG) / R-(TCTTCTAGGAAGTTGATGGAGGTGT)				
Grupo C F- (ATACCAAGGAATCAAGTGTGTGAGT) / R-(ACCACGACCAGCACATCCA)				
<i>Trichodesmium</i> F- (GACGAAGTATTGAAGCCAGGTTTC) / R- (CGGCCAGCGCAACCTA)				
γ -Proteobacteria F- (TTGGCTTTGGCGACATCAA) / R- (ACGACCAGCACAGCCAACCTC)				
Grupo A F- (TAGCTGCAGAAAGAGGAACTGTAGAAG) / R (TCAGGACCACCGGACTCAAC); Grupo B F-(TGCTGAAATGGGTTCTGT TGAA) / R (TCAGGACCACAGATTCTAC ACACT); Grupo C F- (TCTACCCGTTTGATGCTACAC ACTAA)/ R (GGTATCCTTCAAGTAGTACTT CGTCTAGCT); Filamentosas-F (TGGCCGTGGTATTATTACTG CTATC)/ R (GCAAATCCACCGCAAACAAC)	Giro del Océano Pacífico Sur y Océano Atlántico Norte	Cianobacterias unicelulares (UCYN- A, -B y -C) y filamentosas, Gamma Proteobacterias, Grupo III	Librería de clonas y qPCR	(Langlois <i>et al.</i> , 2008; Halm <i>et al.</i> , 2012)

F (ATG TCG GYT GYG AYC CSA ARG C) / R (ATG GTG TTG GCG GCR TAV AKS GCC ATC AT)	Isla de Hawái, Océano Pacífico	Delta y Alfa Proteobacterias, Grupo III	Librería de clonas	(Olson <i>et al.</i> , 2009)
<i>nifH3</i> (ATR TTR TTN GCN GCR TA) / <i>nifH4</i> (TTY TAY GGN AAR GGN GG); <i>univ_UCYN-A_F</i> (AGT TTG CAY TGT AAA GCA CA), <i>univ_UCYN-A_R</i> (TCC TTC ACG GAT AGG CAT AG)	Océano Pacífico y Atlántico (Norte y Sur), y Mar del Coral	UCYN-A	Secuenciación Illumina	(Turk-Kubo <i>et al.</i> , 2017; Henke <i>et al.</i> , 2018; Cornejo- Castillo <i>et al.</i> , 2019)
<i>nifH F</i> (AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC); <i>nifH R</i> (TTGTTSGCSGCRATCATSGCCATCAT)	PNW	Cianobacterias unicelulares (UCYN- A), Alfa, Gamma y Delta Proteobacterias, Grupo III	Secuenciación Illumina	(Li <i>et al.</i> , 2018)

Abreviaturas: ETSP: Pacífico Sur Tropical Oriental, NPSG: Giro Subtropical del Pacífico Norte, ESP: Pacífico Sur Oriental, PNW: Noroeste del Pacífico, SCCS: sistema de corrientes del Sur de California y qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa.

2.2 Fijación biológica de N₂ en sistemas marinos

Las entradas externas de N a los océanos llegan desde los ríos, descargas de aguas subterráneas, desechos directos, la deposición atmosférica y la FBN.

La FBN es el único proceso natural que incorpora N a los sistemas marinos, mientras que otros procesos como la desnitrificación y el anammox representan la pérdida de N fijado en el océano (Pajares y Ramos, 2019). El balance entre estos procesos determina el tamaño del inventario oceánico de N biodisponible y, en consecuencia, la productividad marina (Mulholland y Capone, 2009). Las tasas de FBN son altas en aguas cálidas tropicales oligotróficas y donde hay suficiente disponibilidad de P y Fe en la columna de agua, debido a que la FBN en los océanos está controlada, en parte, por la disponibilidad de estos elementos (Howarth *et al.*, 1988; Zehr *et al.*, 2008). Por otro lado, se sabe que la FBN se ve afectada por la presencia de especies de N disuelto en la columna de agua. Sin embargo, se sugiere que esto sólo ocurre en concentraciones relativamente altas de N disuelto (Jickells *et al.*, 2017).

La mayoría de las investigaciones sobre la medición de tasas de FBN en el océano se han centrado en la cianobacteria filamentosa *Trichodesmium spp.* Esta cianobacteria tiene una distribución cosmopolita en los océanos oligotróficos del mundo, pero es más común en aguas de 20 °C y más cálidas (Capone y Carpenter, 1982; Capone *et al.*, 1997). Los investigadores han optado por proporcionar una estimación de la FBN oceánica extrapolando los datos acumulados de tasas determinadas directamente de la FBN efectuada por *Trichodesmium spp.* en aguas superficiales oligotróficas (Galloway, 2004). Entre los métodos que se han usado ampliamente para medir las tasas de FBN se incluyen la reducción de acetileno, que mide la actividad de la nitrogenasa, y el método del isótopo ¹⁵N₂, que mide la incorporación neta de N₂ en la biomasa (Gandhi *et al.*, 2011).

La tasa anual de FBN por *Trichodesmium* en el océano global fue inicialmente estimada en 5 Tg N por Capone y Carpenter (1982); más tarde Capone *et al.* (1997) actualizaron el dato a una tasa anual de 60 a 80 Tg N (Capone y Carpenter, 1982; Capone *et al.*, 1997). Dicha tasa de FBN por *Trichodesmium* constituye una fracción sustancial de la actual tasa anual de FBN en el océano global, estimada en un intervalo de 100 a 200 Tg N, en la que ahora se sabe que participan otros grupos de microorganismos, de los cuales aún se tiene un

conocimiento limitado con respecto a su identidad y ecología a pesar de la cantidad de estudios realizados hasta la fecha (Karl *et al.*, 2002; Großkopf *et al.*, 2012; Jickells *et al.*, 2017). En particular, se ha demostrado que las cianobacterias del clado UCYN-A, son lo suficientemente abundantes como para contribuir de manera significativa a la FBN en aguas superficiales del océano (Martínez-Pérez *et al.*, 2016). Moisander *et al.* (2010) reportaron tasas de FBN asociadas con muestras ambientales dominadas por los grupos UCYN-A y UCYN-B de $4.5 \text{ nmol N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $0.026 \text{ nmol N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente, en el oligotrófico Océano Pacífico Sur Occidental (Moisander *et al.*, 2010). De la misma manera, Martínez-Pérez *et al.* (2016) reportaron tasas de FBN de 1 a $2 \text{ nmol N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ por UCYN-A en el Océano Atlántico Norte. Por otro lado, estudios recientes han dado a conocer que las regiones oceánicas que tradicionalmente se consideraban desfavorables para la FBN también podrían ser fuentes importantes de N fijado (Fernandez *et al.*, 2011). Se ha demostrado que regiones de surgencia costeras repletas de nutrientes en los océanos tropicales y subtropicales tienen un potencial de FBN significativo (Hamersley *et al.*, 2011; Sohm *et al.*, 2011b). Factores externos como la entrada de polvo, proporcionan micronutrientes (como el Fe), lo que promueve la FBN incluso en zonas adyacentes a las regiones costeras, donde se estima que la tasa de FBN es de $7.51 \text{ nmol N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Wen *et al.*, 2017). Por otra parte, estimaciones en los giros del Atlántico Sur, donde la deposición de polvo de Fe es baja, muestran una tasa baja de FBN en aguas superficiales ($<1.5 \text{ nmol N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), mientras que en la surgencia de Namibia, ubicada al este del giro del Atlántico Sur, se han observado tasas más altas (hasta $\sim 8 \text{ nmol N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (Sohm *et al.*, 2011b).

Tabla 2. Estimaciones de las tasas anuales de FBN en diferentes sistemas marinos.

Sitio	Tasas anuales de FBN (Tg)	Referencia
Océano Global	100–200	(Karl <i>et al.</i> , 2002)
	87–156	(Galloway, 2004)
	137	(Deutsch <i>et al.</i> , 2007)
	106–120	(Gruber, 2008)
	177	(Großkopf <i>et al.</i> , 2012)
	250	(Jickells <i>et al.</i> , 2017)
Océano Pacífico y Atlántico	137	(Luo <i>et al.</i> , 2012)

Atlántico Norte	40–200	(Carpenter y Romans, 1991)
	89.6	(Benavides y Voss, 2015)
Océano Pacífico Norte	56	(Luo <i>et al.</i> , 2012)
Océano Pacífico Sur	46	
Mar Árábigo (ZMO)	15.4	(Gandhi <i>et al.</i> , 2011)

En el Mar Árábigo, una de las principales ZMO, se tienen estimaciones anuales de 15.4 Tg N y^{-1} (Tabla 2); sin embargo, se necesitan mediciones más frecuentes para una mejor cuantificación del balance de N marino, debido a que la variabilidad temporal restringe estimaciones más precisas (Gandhi *et al.*, 2011). También se han reportado tasas diarias de FBN de 0.46 nmol N $L^{-1} d^{-1}$ en aguas superficiales de la ZMO del ETSP frente a Perú y Chile; mientras que las tasas obtenidas en el núcleo de la ZMO (a profundidades de 80–400 m) fueron de 3.5 nmol N $L^{-1} d^{-1}$ (Tabla 3) (Fernandez *et al.*, 2011).

Se sabe que las ZMO contribuyen con una fracción significativa de las pérdidas de N marino global. No obstante, se ha sugerido que la actividad diazotrófica superficial se ve favorecida cerca de áreas con altas tasas de desnitrificación en la columna de agua (Wen *et al.*, 2017). De la misma manera, se ha observado que la deficiencia de O_2 en la columna de agua puede ser responsable de los relativamente altos niveles de FBN observados, aunque aún falta evidencia directa de estos procesos (Wen *et al.*, 2017). Al respecto, Bonnet *et al.* (2013) dieron a conocer nueva información con base en una hipótesis que explica la persistencia de la FBN en entornos con altos niveles de N. Primero, los procesos de pérdida de N crean un déficit de N en relación con el P que favorece la FBN. En segundo lugar, la FBN es un proceso anaeróbico, por lo que es posible que las bajas concentraciones de O_2 en la ZMO contribuyan a la protección de la nitrogenasa, disminuyan el costo de energía para mantener la anaerobiosis intracelular y, por lo tanto, faciliten la FBN. Finalmente, las condiciones redox en la ZMO favorecen la reducción de Fe (II), lo que podría ayudar a soportar los altos requisitos de Fe de la nitrogenasa. Por estas razones, las ZMO pueden representar nichos ecológicos favorables para la FBN.

Tabla 3. Estimaciones de tasas diarias de FBN en diferentes sistemas marinos.

Sitio		Tasas diarias de FBN (nmol N L ⁻¹ d ⁻¹)	Referencia
ETSP	Aguas superficiales ZMO	0.46	(Fernandez <i>et al.</i> , 2011)
	Núcleo ZMO	3.5	
	ZMO	0.6	(Bonnet <i>et al.</i> , 2013)
	ZMO	0.4	(Loescher <i>et al.</i> , 2014)
	Giro del Pacífico Sur	0.88	(Halm <i>et al.</i> , 2012)
	Zona costera	5.1	(Gradoville <i>et al.</i> , 2017a)
Pacífico Sur oeste		0.9	(Benavides <i>et al.</i> , 2015)
ETNP	Giro del Pacífico Norte	3.9	(Gradoville <i>et al.</i> , 2017)
PNW	Sistema de surgencia	0.69	
Surgencia de Namibia		2–8	(Sohm <i>et al.</i> , 2011a)
Atlántico Norte		49.8	(Mulholland <i>et al.</i> , 2012)
		43	(Tang <i>et al.</i> , 2020)
Mar Báltico	ZMO	0.44	(Farnelid <i>et al.</i> , 2013)
Mar de China Meridional	Zona costera	7.51	(Wen <i>et al.</i> , 2017)
Mar Mediterráneo Oriental		4.5	(Zeev <i>et al.</i> , 2008)

Abreviaturas: ETSP: Pacífico Sur Tropical Oriental, ETNP: Pacífico Nortropical Oriental, PNW: Noroeste del Pacífico.

2.3 Diversidad y distribución de fijadores de N₂ en sistemas marinos

Diversos estudios han atribuido la actividad diazotrófica a las cianobacterias limitadas a la capa superficial iluminada por el sol y oligotrófica de los océanos tropicales y subtropicales (ej., Capone y Carpenter, 1982; Zehr, 2011). Sin embargo, los primeros microorganismos marinos que demostraron la capacidad para fijar N₂ fueron bacterias heterótrofas (*Clostridium* y *Azotobacter*) cultivadas en medios libres de N (Waksman *et al.*, 1933) y en la última década se ha descubierto una alta diversidad y una amplia distribución de diazótrofos no cianobacterianos, agrupados en una amplia gama de grupos bacterianos (Zehr *et al.*, 2003). La mayoría de estos microorganismos no han sido cultivados, con excepción de *Vibrio diazotrophicus*, que se ha detectado en algunas muestras de plancton.

En general, los diazótrofos heterotróficos no cultivados se han encontrado en aguas más frías y/o ricas en nutrientes como el Océano Ártico (Blais *et al.*, 2012) y el sistema de surgencia

costera del Pacífico Noroeste (Gradoville *et al.*, 2017), en aguas afólicas ricas en N (Bonnet *et al.*, 2013), en ZMO como en el ETSP (Fernandez *et al.*, 2011; Sohm *et al.*, 2011a), pero también en los giros ultraoligotróficos en el Pacífico Sur (Halm *et al.*, 2012). Asimismo, se han reportado genes *nifH* en proteobacterias pertenecientes a *Azotobacter*, *Vibrio*, *Chromatium purpuratum* y *Alcaligenes faecalis* en los océanos tropicales oligotróficos del Atlántico y Pacífico, en los mares Sargazos y el Caribe (Zehr *et al.*, 1998). En el Pacífico Sur Oriental, se ha sugerido que comunidades de bacterias heterótrofas dominan en la zona de afluencia rica en N del ETSP debido a que la presencia de N inorgánico puede suprimir la FBN por algunos diazótrofos cianobacterianos. No obstante, a pesar de tener una amplia distribución en las principales regiones oceánicas (Bombar *et al.*, 2016), y de que varios autores sugieren que estas bacterias son ecológicamente significativas (Farnelid *et al.*, 2001; Bombar *et al.*, 2013; Turk-Kubo *et al.*, 2014), aun no hay suficientes estudios que demuestren la magnitud de la contribución de estos diazótrofos no cianobacterianos al presupuesto global de la FBN.

Por su parte y a diferencia de los diazótrofos heterotróficos, los diferentes diazótrofos cianobacterianos que habitan en el océano abierto tienen diferentes limitaciones fisiológicas y ecológicas que han dado como resultado distribuciones geográficas muy variables, con grandes implicaciones para el presupuesto del ciclo del N marino (Zehr, 2011). Las cianobacterias fijadoras de N₂ en el océano abierto conocidas hasta la fecha se clasifican en cuatro grupos diferentes, de acuerdo con sus características morfológicas y estilos de vida: El primero corresponde a *Trichodesmium*, un diazótrofo filamentoso de vida libre que no forma heterocistos (células especializadas para la FBN), del cual se descubrió su actividad diazotrófica en 1961 (Dugdale *et al.*, 1961). La contribución sustancial de *Trichodesmium* a las tasas de FBN al ecosistema marino global es ahora indiscutible y de suma importancia ecológica (Capone y Carpenter, 1982; Capone *et al.*, 1990; Bergman *et al.*, 2013). De hecho, *Trichodesmium* es uno de los diazótrofos más abundantes en el océano y se considera el organismo modelo para la FBN (Martínez-Pérez *et al.*, 2016). Este género se ha observado principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del océano (Capone *et al.*, 1997; Bonnet *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2010; Azimuddin *et al.*, 2016).

En el segundo grupo, se encuentran asociaciones de diazótrofos con diatomeas (ADD), las cuales parecen ser importantes fijadores de N₂ en el Océano Pacífico Tropical y Subtropical

del Norte, el Océano Atlántico ecuatorial del Norte, en el Mar Mediterráneo y el Mar de China (Monteiro *et al.*, 2010). Las ADD se han identificado principalmente entre *Richelia intracellularis* y *Calothrix rhizosoleniae*, cianobacterias heterocísticas filamentosas muy extendidas en ambientes pelágicos marinos, y las diatomeas *Hemiaulus hauckii*, *Rhizosolenia clevei*, *Bacteriastrum hyalinum* y *Chaetoceros spp.* (Foster y Zehr, 2006). Se conoce que los simbiontes de *Richelia* se asocian a las superficies de estas diatomeas, entre la pared celular (frústula) y la membrana celular (plasmalema) (Jahson *et al.*, 1995), mientras que los simbiontes de *Calothrix* son extracelulares en la diatomea *Chaetoceros* (Norris, 1961). Se supone que la relación entre la diatomea y la cianobacteria es simbiótica, de manera que las cianobacterias suministran N y/o C al compañero eucariota y a cambio estas diatomeas asociadas influyen positivamente en el crecimiento y metabolismo de sus simbiontes cianobacterianos (Foster y Zehr, 2006; Foster *et al.*, 2011).

El tercer grupo pertenece a dos clados de cianobacterias unicelulares de vida libre (aunque también pueden interactuar indirectamente con otros microorganismos) conocidos como UCYN-B y UCYN-C (Cornejo-Castillo, 2017). UCYN-B fue encontrado por primera vez en aguas oligotróficas del Pacífico Sur Tropical y se descubrió por microscopía gracias a que contiene el pigmento fotosintético ficoeritrina (Neveux *et al.*, 1999). Se ha demostrado que está presente en los océanos Atlántico (Langlois *et al.*, 2005), Pacífico (Church *et al.*, 2009) y en el Mar Arábigo (Mazard *et al.*, 2004). La secuencia de este grupo parece ser idéntica a una cepa cultivada de *Crocospaera watsonii*, vive libremente, colonialmente y también se ha encontrado en simbiosis con la diatomea *Climacodium frauenfeldianum* (Church *et al.*, 2005a; Stal, 2009). Por otra parte, la presencia de UCYN-C se reportó por primera vez en el Océano Atlántico Norte (Foster *et al.*, 2007; Langlois *et al.*, 2008). Su secuencia de nucleótidos *nifH* indica 90% de similitud con *Cyanothece spp.*, aunque la fisiología de este grupo aún se desconoce (Stenegren *et al.*, 2018) y en general son mucho menos abundantes que UCYN-A y UCYN-B (Foster *et al.*, 2007; Langlois *et al.*, 2008).

Finalmente, en 2001 se encontró evidencia de que la FBN por las cianobacterias simbióticas unicelulares UCYN-A podría ser igual o incluso superior a la de *Trichodesmium* en el Océano Pacífico Subtropical del Norte (Zehr *et al.*, 2001). Otros autores también indicaron que estas cianobacterias podrían estar aumentando significativamente la estimación del aporte global de N a los océanos (Cabello *et al.*, 2016; Farnelid *et al.*, 2016). En 1998, en la estación

ALPHA en el Océano Pacífico Norte se descubrió a este grupo de cianobacterias basándose en una secuencia corta del gen *nifH* (Zehr *et al.*, 1998). Desde entonces, se ha empleado una amplia variedad de técnicas basadas en PCR (Church, 2005a; Turk-Kubo *et al.*, 2017; Moreira-Coello *et al.*, 2019; Cabello y Zehr, 2020), FISH (Biegala y Raimbault, 2008; Thompson *et al.*, 2012), secuenciación del genoma acoplada a citometría de flujo (Zehr *et al.*, 2008), espectrometría de masas de iones secundarios a nanoescala (nanoSIMS) (Thompson *et al.*, 2012; Krupke *et al.*, 2015), metagenómica y metatranscriptómica (Cabello *et al.*, 2016) para obtener información sobre la distribución y ecología de UCYN-A (Tabla 4).

Las poblaciones de UCYN-A se han dado a conocer en los últimos años como uno de los fijadores de N₂ más abundantes y más ampliamente distribuidos, encontrándose en aguas frías (Cabello y Zehr, 2020) y aguas enriquecidas en N (Turk-Kubo *et al.*, 2018), incluidos los mares polares (Shiozaki *et al.*, 2017; Friesen y Riemann, 2020), aguas costeras (Mulholland *et al.*, 2012; Bentzon-tilia *et al.*, 2015) y regiones de surgencia (Moreira-Coello *et al.*, 2019). Se conoce que este grupo carece del fotosistema II y de la enzima RuBisCO, es decir, del ciclo completo del ácido tricarbóxico, así como de una variedad de otras vías metabólicas (Zehr *et al.*, 2008, 2016), por lo tanto, se presenta como simbionte de otros organismos. Estas cianobacterias unicelulares recibieron el nombre de *Candidatus Atelocyanobacterium thalassa*, que significa cianobacteria marina incompleta (Zehr *et al.*, 2016) y están relacionadas con un alga unicelular marina (haptófito) no cultivado (Thompson *et al.*, 2012). UCYN-A fija N₂ que intercambia con el haptófito asociado y, a cambio, este compañero fotosintético le transfiere C a la cianobacteria (Zehr *et al.*, 2016).

Con base en la diversidad genética de *nifH*, se han detectado cuatro sublinajes distintos de UCYN-A, llamados UCYN-A1, -A2, -A3 y -A4 (Thompson *et al.*, 2014). Thompson *et al.* (2014) reportaron que las secuencias de ADN y aminoácidos entre estos tipos de UCYN-A son sorprendentemente divergentes, además sus genomas tienen una serie de genes únicos para cada grupo, lo que podría contribuir a diferencias fisiológicas ecológicamente relevantes. Se ha encontrado que UCYN-A1 y UCYN-A3 se distribuyen típicamente en aguas oligotróficas, mientras que UCYN-A2 y UCYN-A4 están asociadas a zonas costeras (Turk-Kubo *et al.*, 2017). Sin embargo, también se ha encontrado que UCYN-A1 y UCYN-A2 co-ocurren en aguas costeras en el Pacífico Norte (Thompson *et al.*, 2014; Cornejo-

Castillo *et al.*, 2019), y en el oeste del Pacífico Sur Tropical (Turk-Kubo *et al.*, 2015; Henke *et al.*, 2018; Stenegren *et al.*, 2018). Todavía no está claro si la co-ocurrencia de UCYN-A1 en aguas de influencia costera es el resultado de la entrada de aguas oligotróficas o la adaptación al hábitat (Cabello *et al.*, 2020).

Por otro lado, también se ha observado que los distintos sublinajes son diferentes en el tamaño y en el número de células asociadas por huésped. UCYN-A2 es de mayor tamaño (~2–3 μm) y tiene un huésped identificado como *Braarudosphaera bigelowii* (4–10 μm), UCYN-A1 es de menor tamaño (~1 μm) y tiene un huésped (~2 μm) aún no identificado pero que parece ser pariente cercano de *B. bigelowii* (Martínez-Pérez *et al.*, 2016), mientras que ningún huésped ha sido propuesto para UCYN-A3. Hasta la fecha, está claro que hay distintos pares de huéspedes y grupos UCYN-A, aunque puede haber una diversidad aún más amplia y una especificidad desconocida de las asociaciones (Zehr *et al.*, 2016).

Tabla 4. Estudios oceanográficos representativos de UCYN-A (ordenados cronológicamente).

Lugar de estudio	Método	Descubrimiento	Referencia
Océano Pacífico Norte	PCR y Secuenciación por Sanger <i>nifH</i>	Primera secuencia <i>nifH</i> UCYN-A	(Zehr <i>et al.</i> , 1998)
Océano Pacífico Norte subtropical	RT-PCR <i>nifH</i>	Cianobacterias unicelulares en el océano abierto expresan nitrogenasa	(Zehr <i>et al.</i> , 2001)
Giro subtropical del Pacífico Norte	Isotopía $^{15}\text{N}_2$	Reporte de altas tasas de FBN fue por UCYN-A y B	(Montoya <i>et al.</i> , 2004; Grabowski <i>et al.</i> , 2008)
Mar Árabe	PCR <i>nifH</i>	Amplificación del gen 16S ARNr con primers genéricos de UCYN	(Mazard <i>et al.</i> , 2004)
Océano Pacífico Norte	RT-PCR <i>nifH</i>	UCYN-A mostró niveles altos de transcripciones <i>nifH</i> durante el día cuando estaba generando O_2	(Church <i>et al.</i> , 2005a, 2005b)
Océano Pacífico Suroeste	Uso de primers UCYN para sondas FISH	Primeras imágenes microscópicas de UCYN-A	(Biegala y Raimbault, 2008)
Océano Pacífico Norte	Metagenómica y citometría de flujo	UCYN-A carece de genes para el fotosistema II	(Zehr <i>et al.</i> , 2008)
Océano Pacífico Norte	Pirosecuenciación	UCYN-A carece de RuBisCO (fijación de C), ciclo del ácido tricarbóxico y una serie de vías involucradas en la síntesis de aminoácidos y purinas	(Tripp <i>et al.</i> , 2010)
Océano Pacífico Sur	PCR y qPCR <i>nifH</i>	UCYN-A tiene una distribución latitudinal más amplia que <i>Trichodesmium</i> ; la temperatura es el principal impulsor de su distribución	(Moisander <i>et al.</i> , 2010)
Océano Pacífico Norte	FISH del gen 16S ARNr específico de UCYN-A	Visualización de simbiosis UCYN-A con un alga unicelular primnesiofita estrechamente relacionada con <i>B. bigelowii</i> . UCYN-A recibió el nombre provisional de <i>Ca. Atelocyanobacterium thalassa</i>	(Thompson <i>et al.</i> , 2012)
Océano Pacífico Norte y Océano Atlántico	Experimentos de isótopos estables y nanoSIMS	Establecimiento de la base mutualista de la simbiosis. UCYN-A fija N_2 e intercambia N con la pareja primnesiofita, a cambio, el C fijado a través de la fotosíntesis del alga es transferido a UCYN-A	(Thompson <i>et al.</i> , 2012; Krupke <i>et al.</i> , 2015)
Mar de Japón	Microscopía electrónica de transmisión (TEM), PCR del 16S ARNr	Confirmación de que UCYN-A está asociado con <i>B. bigelowii</i> en aguas costeras	(Hagino <i>et al.</i> , 2013)
Océano Pacífico Norte	Fluorescencia, qPCR y secuenciación Illumina de <i>nifH</i>	Detección de un segundo linaje de UCYN-A, llamado UCYN-A2	(Bombar <i>et al.</i> , 2014)

Océano Atlántico y Pacífico	Secuenciación del gen ARNr 18S. Análisis filogenético <i>nifH</i>	<i>B. bigelowii</i> identificado como el anfitrión de UCYN-A2. UCYN-A está representado por tres clados distintos: UCYN-A1, UCYN-A2 y UCYN-A3	(Thompson <i>et al.</i> , 2014)
Océano Pacífico	PCR y FISH	Los sublinajes UCYN-A1 y UCYN-A2 son claramente diferentes en tamaño	(Thompson <i>et al.</i> , 2014; Cabello <i>et al.</i> , 2016)
Océano global (Pacífico, Atlántico e Índico)	Metagenómica y metatranscriptómica	UCYN-A y sus huéspedes siempre están en simbiosis	(Cabello <i>et al.</i> , 2016)
Océano Pacífico	PCR y FISH	UCYN-A1 tiene una o dos células separadas por huésped. UCYN-A2 puede albergar hasta 10 células por célula compañera de primnesiofito	(Cornejo-Castillo <i>et al.</i> , 2016)
Giro subtropical del Pacífico Norte	PCR y secuenciación Illumina	Se reveló por primera vez la amplia distribución de UCYN-A3 en aguas oligotróficas. UCYN-A1 y UCYN-A3 se distribuyen típicamente en aguas oligotróficas, UCYN-A2 y UCYN-A4 en zonas costeras	(Turk-Kubo <i>et al.</i> , 2017)
Océano Pacífico Norte	qPCR y CARD-FISH del 16S ARNr específico de UCYN-A	UCYN-A2 como sublinaje dominante. Se detectaron las abundancias más altas jamás reportadas ($\sim 3 \times 10^6$ copias <i>nifH</i> · L ⁻¹)	(Cabello <i>et al.</i> , 2020)
Giro Subtropical del Pacífico Norte	CARD-FISH y nanoSIMS	La FBN por UCYN-A está fuertemente ligada a la luz, tanto a través del ciclo de luz diurna como a través del gradiente vertical de luz con la profundidad	(Gradoville <i>et al.</i> , 2021)
Océano Pacífico Norte (SCCS)	PCR y secuenciación Illumina	La FBN por UCYN-A1 fue más importante en el océano abierto, mientras que para UCYN-A2 fue en aguas costeras. Cuando estos sublinajes coexisten, su actividad se ve influenciada por diferentes factores ambientales	(Turk-Kubo <i>et al.</i> , 2021)
Mar Mediterráneo	PCR y secuenciación Illumina	UCYN-A presentó diferentes distribuciones verticales: UCYN-A1 y -A3 fue dominante en la superficie y UCYN-A4 en las profundidades más productivas (61 y 88 m)	(Ridame <i>et al.</i> , 2022)

Abreviaturas: SCCS: sistema de corrientes del Sur de California, qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa, RT-PCR: PCR de transcripción inversa, CARD-FISH: hibridación in situ de fluorescencia de deposición de reportero doble catalizado y nanoSIMS: espectrometría de masas de iones secundarios a nanoescala.

2.4 Factores que afectan a la fijación de N₂ en sistemas marinos

La historia evolutiva de la diazotrofia evidencia varios factores que se han considerado como dominantes sobre los diazótrofos, limitando su distribución y la magnitud de la FBN en el océano global, destacando la inhibición de la actividad de la nitrogenasa en presencia de O₂, la temperatura, las concentraciones de P y Fe, la presencia de nutrientes y el pastoreo del zooplancton (Mulholland y Capone, 2009; Tang *et al.*, 2020). La inactivación de la enzima nitrogenasa en presencia de O₂ constituye un problema para la mayoría de los diazótrofos que requieren hábitats superficiales iluminados para realizar la fotosíntesis, donde el O₂ disuelto se encuentra en altas concentraciones (Mulholland y Capone, 2009). Por lo anterior, los diazótrofos requieren de distintos mecanismos para evitar la inactivación de la nitrogenasa (Muñoz-Marín *et al.*, 2019). Por ejemplo, *Trichodesmium* fija N₂ durante el día mientras realiza activamente la fotosíntesis mediante la segregación de la nitrogenasa activa en células especializadas denominadas "diazocitos", un mecanismo de secuestro de nitrogenasa "espacial" que le proporciona una separación de las actividades fotosintéticas y de la FBN (Bergman *et al.*, 2013). Otras cianobacterias generan células de FBN especializadas llamadas heterocistos, las cuales protegen a la nitrogenasa de la inhibición por el oxígeno molecular y que, a diferencia de los diazocitos, son células diferenciadas envueltas por una capa de glicolípidos (Zehr y McReynolds, 1989; Saunders, 2003; Mulholland y Capone, 2009). Por otro lado, UCYN-B y UCYN-C fijan N₂ por la noche, mientras que UCYN-A fija N₂ durante el día, debido a que carece de la capacidad de utilizar el fotosistema II que genera O₂ (Zehr *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2014). Sin embargo, su asociación con un socio generador de O₂ podría hacer que la enzima nitrogenasa en UCYN-A no esté completamente a salvo del O₂. Puede ser que UCYN-A requiera un alto nivel de expresión del gen *sufB* (involucrado en la reparación de grupos de Fe-azufre (S) lábiles al O₂ bajo estrés oxidativo) para reparar a la enzima nitrogenasa de la inactivación oxigénica (Cornejo-Castillo *et al.*, 2016).

Otro factor clave para los diazótrofos es la temperatura del agua. Las cianobacterias marinas fijadoras de N₂ generalmente tienen una distribución tropical o subtropical (Mulholland y Capone, 2009). Por ejemplo, la distribución de *Trichodesmium* parece estar limitada por la isoterma de 20 °C (Capone *et al.*, 1997; Langlois *et al.*, 2005, 2008). Por su parte, los grupos UCYN-B y UCYN-C han mostrado un crecimiento óptimo y FBN activa de 26 a 30 °C en

los océanos Atlántico y Pacífico (Mazard *et al.*, 2004; Stal, 2009; Moisander *et al.*, 2010). En cuanto a los sublinajes UCYN-A, aún se sabe muy poco. Cabello *et al.* (2020) detectaron UCYN-A2 en un intervalo de temperatura de 11 a 18 °C en el océano Pacífico Norte (Cabello *et al.*, 2020), lo que concuerda con datos de temperatura reportados en otras áreas oceanográficas (Thompson *et al.*, 2014; Moreira-Coello *et al.*, 2019). Recientemente, se ha reportado actividad de FBN para este sublinaje a una temperatura ≥ 10 °C (Shiozaki *et al.*, 2020), mientras que otros autores han reportado que UCYN-A2 está ausente a temperaturas superiores a 25 °C (Cabello *et al.*, 2016). Turk-Kubo *et al.* (2017) dieron a conocer que el sublinaje UCYN-A3 habita en co-ocurrencia con UCYN-A1 en un ambiente cálido (> 20 °C), en aguas tropicales y subtropicales de los giros oligotróficos del océano.

Por otra parte, el Fe es un cofactor crítico para la nitrogenasa y su biodisponibilidad es otro de los factores más importantes en la FBN oceánica (Howard y Rees, 1996). El suministro de Fe para soportar la FBN difiere significativamente entre los hábitats pelágicos y bentónicos. En el océano abierto, el Fe se suministra tanto por la corriente ascendente/mezcla desde abajo como desde la atmósfera (Karl *et al.*, 2002). La limitación de Fe es particularmente importante para la FBN por cianobacterias, ya que el Fe es un cofactor del fotosistema I y un componente de la nitrogenasa (así como de otras enzimas redox). Se ha demostrado que la actividad diazotrófica de *Trichodesmium* puede estar limitada por P o Fe, o estar co-limitada por ambos (Shi *et al.*, 2007; Sohm *et al.*, 2011a), mientras que se sabe poco sobre cómo UCYN-A responde a la limitación de nutrientes. Un estudio reciente reportó que el Fe y el P son los principales factores que influyen en la FBN por UCYN-A en el Atlántico Norte tropical (Krupke *et al.*, 2015). Turk-Kubo *et al.* (2012) encontraron que las adiciones de Fe y P provocaron cambios espacialmente heterogéneos en la FBN en el Atlántico Norte tropical y causaron respuestas variables entre diferentes filotipos de cianobacterias, lo que sugiere que no todos los diazótrofos están limitados por el mismo nutriente en el tiempo y el espacio (Turk-Kubo *et al.*, 2012). En particular, UCYN-A respondió a las adiciones de P con un aumento en la expresión del gen *nifH* (Turk-Kubo *et al.*, 2012).

En cuanto a la presencia de formas combinadas de N inorgánico disuelto (NID), se ha evidenciado que la FBN de UCYN-A no es inhibida en aguas con alto contenido de NID (Krupke *et al.*, 2015). Se sugiere que en ocasiones la simbiosis UCYN-A/haptófito puede

complementarse con una fuente de N distinta a la FBN por UCYN-A cuando el NID está disponible para el haptófito. Tanto UCYN-A como su anfitrión dependen de la FBN para sus necesidades de N incluso en presencia de abundante NID, el cual se ha descubierto que puede estimular la FBN (Mills *et al.*, 2020).

La mayoría de los modelos oceánicos de FBN suponen que todos los diazótrofos están igualmente controlados por los mismos parámetros ambientales, a pesar de las bien reconocidas diferencias genéticas, repertorios para asimilación de reservas de nutrientes disueltos, historias de vida (libre, simbiótica, colonial) y tamaños de células (micrómetros a milímetros). Se necesitan más datos temporales y/o espaciales en las regiones oceánicas del mundo para caracterizar mejor los patrones de co-ocurrencia de los diazótrofos y comenzar a comprender los factores ambientales que influyen en las distribuciones de los fijadores de N₂ en sistemas marinos (Turk-Kubo *et al.*, 2017).

2.5 Zonas de mínimo oxígeno

Las ZMO se encuentran típicamente en los límites occidentales de los márgenes continentales, en donde los patrones de circulación impulsados por el viento empujan las aguas ricas en nutrientes hacia la superficie en un proceso conocido como surgencia costera. Este proceso fertiliza las aguas superficiales y produce altos niveles de producción primaria (Paulmier y Ruiz-Pino, 2009). Gran parte del C inorgánico que se fija a través de la fotosíntesis es respirado por microorganismos heterótrofos en las capas superficiales y medias de la columna de agua. La deficiencia persistente de O₂ ocurre cuando la cantidad de O₂ disuelto en la columna de agua se consume más rápido de lo que se reabastece a través del intercambio aire-mar, la producción fotosintética de O₂ y la ventilación, produciéndose una ZMO (Lam *et al.*, 2009). El umbral indicado para definir a una ZMO es de $\leq 20 \mu\text{M O}_2$ (Smethie, 1987; Paulmier y Ruiz-Pino, 2009). Estas zonas constituyen sólo el 1% del volumen oceánico global, pero tienen un profundo impacto en el balance del N oceánico debido a que alrededor del 30-50% del N fijado marino se pierde como N₂ en los océanos (Codispoti *et al.*, 2001). Las principales ZMO se localizan en el ETNP, frente a México, el ETSP en Perú y Chile, el Océano Atlántico (las surgencias del noroeste de África y de Namibia) y el Mar Arábigo (Figura 2) (Paulmier y Ruiz-Pino, 2009). Las ZMO del Pacífico

son más voluminosas que las del Océano Atlántico y el Mar Árabe debido a la disminución de la ventilación en latitudes altas (donde se forman las aguas profundas del Pacífico) (Wright *et al.*, 2012), y debido a que las masas de agua en el Pacífico Nororiental son “viejas” y presentan poco oxígeno en comparación con las masas de agua del Pacífico sur. En el Pacífico oriental, la extensa ZMO se puede explicar por el hecho de que las aguas profundas medias son aguas con poca o escasa movilidad, las cuales no se han renovado por procesos de circulación (forzamiento externo o circulación termohalina) lo que conlleva a una disminución del contenido de oxígeno disuelto (Serrano, 2012).

La comprensión del ciclo del N marino es difícil y es aún más complejo en las ZMO debido a las múltiples transformaciones microbianas que ocurren y a la complejidad del hábitat (Pajares y Ramos, 2019). Como se mencionó anteriormente, estas zonas son importantes para la pérdida neta de N del océano (Jayakumar *et al.*, 2017). Esta disminución relativa en la disponibilidad de N asociada a las pérdidas de N, las bajas concentraciones de O₂, la liberación de P y las concentraciones de Fe biodisponible relativamente altas deberían favorecer la FBN en las ZMO (Deutsch *et al.*, 2001, 2007). Los esfuerzos para probar esta idea se han centrado en la ZMO del ETSP. Diversas investigaciones han reportado FBN en aguas superficiales y profundas (anóxicas) en esta región (Fernandez *et al.*, 2011; Bonnet *et al.*, 2013; Loescher *et al.*, 2014), así como la presencia de distintos grupos de diazotófos, demostrando que las ZMO son un ambiente ideal para la diazotrofia marina (Bopp *et al.*, 2002). De igual manera, diversos estudios sobre la diversidad del gen *nifH* en las ZMO presentes en el ETSP, ETNP y el Atlántico Norte, han reportado que las comunidades diazotróficas identificadas difieren fuertemente en estos océanos (Fernandez *et al.*, 2011; Halm *et al.*, 2012; Farnelid *et al.*, 2013).

En las ZMO localizadas en el ETNP, ETSP y el Mar Árabe se ha encontrado que los fijadores de N₂ forman una comunidad singular, compuesta principalmente por bacterias heterótrofas, diferentes clados de alfa, beta y gamma proteobacterias no cultivadas, bacterias anaerobias, y arqueas metanógenas, así como una baja presencia de cianobacterias (Fernandez *et al.*, 2011; Halm *et al.*, 2012; Bonnet *et al.*, 2013; Jayakumar *et al.*, 2017; Löscher *et al.*, 2020). Loescher *et al.* (2014) reportaron la detección de UCYN-B en la ZMO frente a Perú, pero no la presencia de otros grupos de UCYN (Loescher *et al.*, 2014), a pesar de que en los últimos años estos grupos de cianobacterias se han considerado diazotófos

clave en las aguas superficiales del océano (Church *et al.*, 2005a). El papel y la importancia de los diazótrofos cianobacterianos para el presupuesto de N oceánico en estas zonas no son claros debido a la información limitada sobre su distribución biogeográfica, abundancia y actividad, en especial, hasta la fecha no se ha reportado la presencia del grupo UCYN- A en las ZMO.

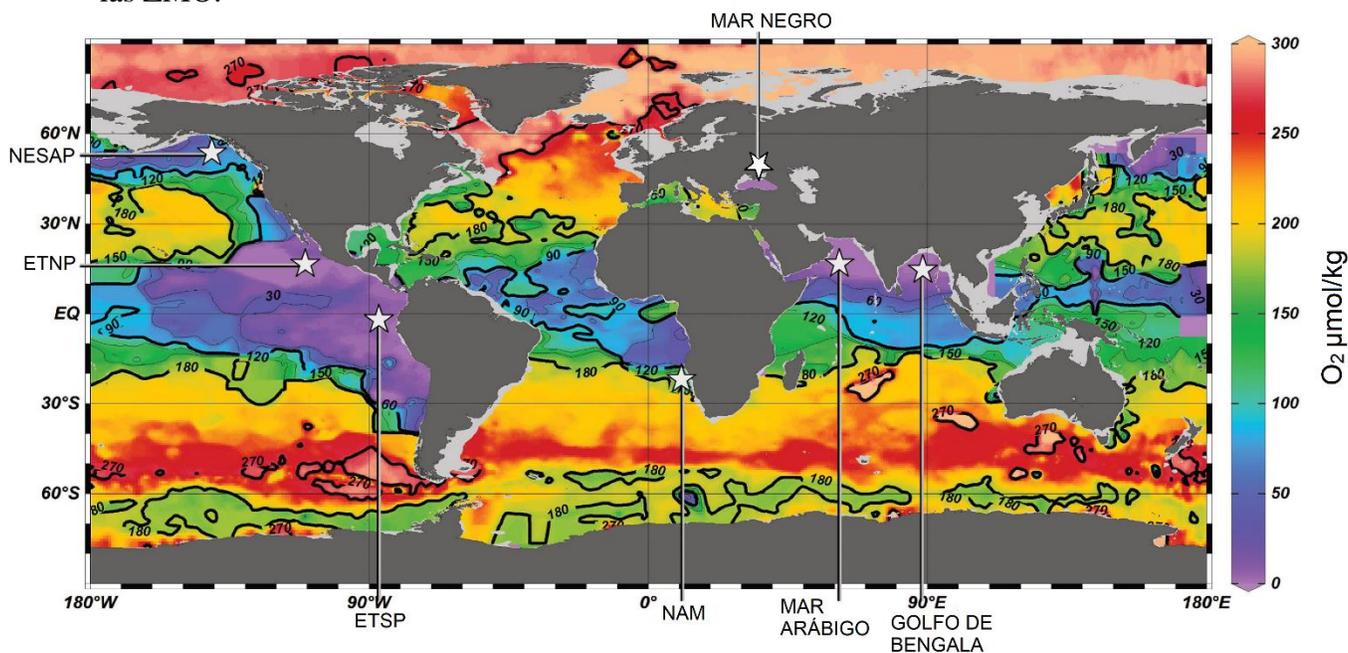


Figura 2. Mapa de las principales ZMO y sus concentraciones de O₂ a 300 m de profundidad (Long *et al.*, 2021). Abreviaturas: NESAP: Pacífico Subártico Nororiental, ETNP: Pacífico Nortropical Oriental, ETSP: Pacífico Sur Tropical Oriental y NAM: Surgencia de Namibia.

3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Actualmente, el papel y la importancia de las cianobacterias simbióticas unicelulares UCYN-A en términos de la cantidad de N fijado en las ZMO no se ha evaluado aún debido a la escasa información sobre la distribución y abundancia de este clado de cianobacterias. Hasta el momento solo se ha reportado la presencia de diazótrofos heterótrofos y del clado UCYN-B en estas regiones oceánicas, las cuales cambian la estructura y la función de las comunidades microbianas marinas, alterando los ciclos de nutrientes e influyendo en el balance del N marino. Además, estas zonas se están expandiendo principalmente debido a las actividades antropogénicas. Por lo tanto, es de suma importancia aportar información acerca de la distribución y diversidad de UCYN-A en las ZMO, en particular en el ETNP, una de las zonas más extensas e intensas del océano global, además de las menos estudiadas.

Esta investigación, la cual sería la primera realizada en el ETNP, nos permitirá tener una comprensión inicial del papel que juegan las UCYN-A en las ZMO, así como de la influencia de las condiciones ambientales marinas en la distribución de UCYN-A en una ZMO.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cuál es la distribución espacial y temporal del clado UCYN-A, portador del gen *nifH*, en la columna de agua en un transecto frente al puerto de Mazatlán, localizado en la ZMO del Pacífico mexicano?
- ¿Cómo afecta la cantidad de nutrientes y las propiedades oceanográficas de esta ZMO en la distribución y diversidad de UCYN-A?

5. HIPÓTESIS

- Dado que el clado UCYN-A se distribuye más ampliamente que otras cianobacterias marinas fijadoras de N₂, se espera encontrar la presencia de este clado de diazótrofos tanto en la zona costera rica en N como en el océano abierto oligotrófico a lo largo de un transecto localizado en la ZMO del ETNP.

- Dado que el huésped de UCYN-A se encuentra en la zona fótica, debido a que es un organismo eucarionte fotosintético, se espera encontrar mayor diversidad del clado UCYN-A en la superficie y el primer máximo de clorofila que en las capas correspondientes al final de la oxiclina y ZMO, en donde hay pocos o nulos niveles de O₂ a lo largo de un transecto en el ETNP.
- En la temporada de surgencia, primavera, se espera encontrar la misma distribución de UCYN-A en dos años consecutivos de muestreo.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Estudiar la distribución y la diversidad espacial y temporal del clado de cianobacterias simbióticas unicelulares UCYN-A fijadoras de N₂ en un transecto frente al Puerto de Mazatlán, localizado en la ZMO del Pacífico mexicano.

6.2 Objetivos específicos:

- Realizar la secuenciación masiva del gen *nifH* presente en UCYN-A en muestras obtenidas en la columna de agua en un transecto frente al Puerto de Mazatlán, localizado en la ZMO del Pacífico mexicano, en dos años consecutivos de muestreo.
- Realizar la filogenia del gen *nifH* presente en UCYN-A y determinar su distribución y diversidad en esta ZMO.
- Establecer una relación entre las propiedades oceanográficas y la concentración de nutrientes con la distribución y la diversidad de UCYN-A en esta ZMO.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Área de estudio y estrategia de muestreo

El área de estudio se localiza frente al Puerto de Mazatlán, en la zona de entrada del Sur del Golfo de California, la cual está en comunicación abierta con el Océano Pacífico Tropical Oriental. Este estudio se llevó a cabo a bordo del buque oceanográfico “El Puma” de la UNAM en el mes de abril, en un transecto con cuatro estaciones de muestreo en el año 2018 (Crucero MAZ IV) y cinco estaciones de muestreo en 2019 (Crucero MAZ V), el cual abarca de una zona costera a una oceánica en plena ZMO (Figura 3). En ambos cruceros, la estación C representa la estación más costera (32 m de profundidad), las estaciones O2 son las más oceánicas (con una profundidad media de 690 m) y las estaciones M representan la zona intermedia entre ellas.

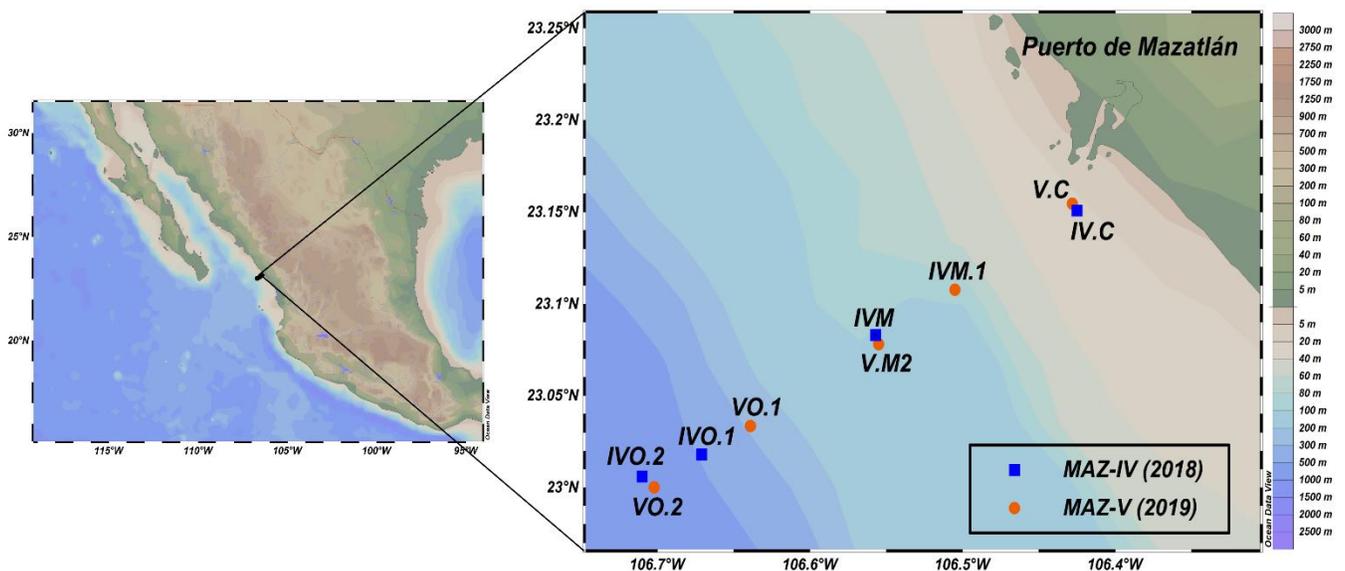


Figura 3. Mapa de la localización del transecto de estudio, de una zona costera a una oceánica en frente del Puerto de Mazatlán. Abreviaturas: C = estación costera, M = estaciones medias 1 y 2, O = estaciones oceánicas 1 y 2. Los símbolos y colores denotan el crucero (MAZ IV= cuadrado azul, MAZ V= círculo naranja).

7.2 Toma de muestras

En cada estación se adquirieron datos *in situ* de temperatura, conductividad, clorofila *a* y O₂, desde la superficie hasta el fondo con una sonda CTD (SeaBird 19 plus) configurada con sensores de fluorescencia activa (ECO-Wet Labs) y O₂ (SBE 49), acoplada a una roseta General Oceanics. Se tomaron muestras de agua con botellas tipo Niskin de 10 L de capacidad a diferentes profundidades. Para los análisis moleculares, se consideraron sólo las siguientes profundidades: superficie, primer máximo de clorofila (PMC), final de la oxiclina, núcleo de la ZMO y/o fondo mientras que, para la determinación de la concentración de nutrientes se tomaron en cuenta otras profundidades, además de las mencionadas anteriormente.

Las muestras de agua (aproximadamente 4 L) fueron filtradas a bordo del buque con membranas Merck-Millipore de 0.22 µm de tamaño de poro. Los filtros se congelaron a -80 °C para ser procesados posteriormente en laboratorio, mientras que parte del agua filtrada se congeló a -20 °C para el análisis de los nutrientes.

7.3 Parámetros hidrográficos y químicos

Los datos provenientes del CTD fueron inicialmente procesados siguiendo los protocolos, recomendaciones y el software del fabricante (SBE data processing v.7.26.7), promediándolos a cada metro de profundidad. Los datos de fluorescencia del perfilador fueron transformados a unidades de clorofila *a* (mg m⁻³) con base en el archivo nominal de calibración por parte del fabricante.

En el laboratorio de Biogeoquímica Acuática del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICML, UNAM) se determinaron las concentraciones de nutrientes (NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻, fosfato [PO₄³⁻] y silicato [SiO₂]) con un autoanalizador de flujo segmentado Skalar San Plus System, utilizando los métodos estándar adaptados por Grasshoff *et al.* (2009). Se construyeron secciones verticales de los parámetros hidrográficos y de nutrientes a lo largo del transecto de cada crucero con el software Ocean Data View v. 5.2.0 (ODV) (Schlitzer, 2002). Se elaboraron diagramas de temperatura-salinidad (T-S) para la identificación de las masas de agua presentes en cada crucero con base en la clasificación propuesta por Portela

et al. (2016). Finalmente, en la página web de la administración nacional oceánica y atmosférica (NOAA, por sus siglas en inglés) se consultaron los valores de la temperatura superficial del mar (TSM) de acuerdo con el índice bimensual de El Niño/Oscilación del Sur (MEI.v2), con el fin de detectar las anomalías de temperatura superficiales en la zona de estudio. Este índice combina tanto variables oceánicas como atmosféricas y toma en cuenta cinco variables diferentes (presión al nivel del mar, TSM, componentes zonal y meridional del viento de superficie y radiación de onda larga saliente) sobre la cuenca del Pacífico tropical (30°S - 30°N y 100°E - 70°W).

7.4 Análisis moleculares

En el laboratorio de Ecología Microbiana Acuática del ICML se llevaron a cabo los análisis moleculares de las muestras pertenecientes a las cuatro estaciones del crucero MAZ IV y a las estaciones IV.C, IV.M2 y IV.O2 del crucero MAZ V. Para la extracción del ADN de las muestras de agua se utilizó el kit DNA easy PowerWater (QIAGEN). La concentración de ADN se midió con un Fluorómetro Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific).

Para la preparación de las bibliotecas genómicas se realizó una PCR anidada. Para la primera ronda de amplificación se usaron los primers universales *nifH3/nifH4* (Zani *et al.*, 2000) y las siguientes condiciones de termociclaje: desnaturalización inicial del ADN a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C (1 min), alineamiento a 57 °C (1 min) y extensión a 72 °C (1 min), seguida de una extensión final a 72 °C (7 min). Para la segunda ronda se utilizaron los primers específicos de UCYN-A *univ_UCYN-A_F/ univ_UCYN-A_R* (Turk-Kubo *et al.*, 2017) y las siguientes condiciones de termociclaje: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C (30 s), alineamiento a 55 °C (30 s) y extensión a 72 °C (30 s), seguido de una extensión final a 72 °C (7 min). Las concentraciones finales de las reacciones de PCR fueron: Buffer My Taq 1x (1 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂), primers 0.5 µM, BSA 0.2 mg/mL y My Taq polimerasa 0.025 u/µL.

La amplificación correcta del gen se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, se realizó la purificación de los productos de PCR usando el kit de purificación de bandas Gel/PCR QIAquick (QIAGEN) y se midió la concentración y la

calidad del ADN de los productos purificados con Qubit 3.0 y Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Para la secuenciación, se seleccionaron los productos en los que se obtuvo una concentración mínima de 10 ng/μL de ADN después de la purificación. Se mandaron a secuenciar 11 muestras (seis muestras del crucero MAZ IV y cinco muestras del crucero MAZ V) al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV- LANGEBIO). En dichas instalaciones, se realizaron rondas adicionales de amplificación para agregar códigos de barras específicos a cada muestra y adaptadores de secuenciación a los amplicones finales. Para la secuenciación se utilizó la plataforma Illumina MySeq DNA nano inserto sin fragmentar 2 x 300 pb (extremos emparejados o paired-end).

7.5 Análisis bioinformáticos

Las secuencias obtenidas en formato FASTQ multiplexadas fueron importadas en el programa QIIME 2 v. 2021.2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Bolyen *et al.*, 2019), en el cual se realizó el procesamiento de las lecturas, comenzando con la demultiplexación de los datos. Posteriormente, se realizó la evaluación de la calidad de cada base de las secuencias obtenidas por muestra.

Para corregir los errores de secuenciación y discriminar entre las secuencias de interés, se utilizó el algoritmo DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) mediante el complemento “q2-DADA2-denoise-single” en QIIME 2. Se realizó el dereplicado de las secuencias, la identificación y remoción de quimeras y, finalmente, la generación de variantes de secuencia de amplicones (ASVs por sus siglas en inglés).

7.6 Asignación taxonómica

Las secuencias de ASVs representativas obtenidas en QIIME 2 se exportaron en formato “fasta”, se editaron utilizando scripts bash en Ubuntu y se clasificaron con una base de datos de referencia del gen *nifH* usando la paquetería DADA2 (Callahan *et al.*, 2021) en RStudio v.1.4.1103 (RStudio Team, 2021). Para ello, se usó la base de datos de referencia del

laboratorio de Zehr (Heller, 2014) (versión de junio de 2017; <https://www.jzehrlab.com/nifH>), la cual fue exportada desde ARB y editada para ser procesada en DADA2 (Moynihan, 2020).

Las secuencias representativas no asignadas a alguna secuencia *nifH* de referencia fueron eliminadas. Posteriormente, las secuencias asignadas al gen *nifH* se compararon con una base de datos de referencia específica de secuencias UCYN-A proporcionada por el laboratorio de Zehr (Turk-Kubo *et al.*, 2017).

Cabe mencionar que se realizó un análisis de oligotipificación para una resolución filogenética más fina usando el software de código abierto Oligotyping en la terminal Ubuntu, siguiendo el pipeline descrito por Eren *et al.* (2013). Para ello, se procesaron las muestras (por separado) en QIIME 2 para obtener secuencias de ASVs representativas por cada muestra y se realizó la asignación taxonómica en RStudio usando DADA2. Las secuencias de cada muestra asignadas a UCYN-A se separaron y editaron en un archivo fasta para ser importadas al programa Oligotyping, donde se realizó un análisis de entropía de Shannon siguiendo el pipeline de Turk-Kubo *et al.* (2017), que permite determinar 13 posiciones de nucleótidos con alta variabilidad para poder descomponer las secuencias en oligotipos. Finalmente, se rarificó el número de lecturas en cada muestra utilizando la profundidad de secuenciación mínima en QIIME 2 y se realizaron gráficas de barras basadas en los distintos oligotipos encontrados de los sublinajes con las paqueterías phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013), dplyr (Hadley Wickham *et al.*, 2020) y ggplot2 (Wickham *et al.*, 2020) en RStudio.

7.7 Análisis filogenético

Para realizar el análisis filogenético se tomaron las secuencias de ASVs representativas más abundantes de cada oligotipo, las secuencias de referencia de oligotipos encontrados de los sublinajes UCYN-A y algunas secuencias de referencia de cianobacterias unicelulares estrechamente relacionadas como UCYN-B y -C (Thompson *et al.*, 2014; Turk-Kubo *et al.*, 2017; Cornejo-Castillo *et al.*, 2019).

En el software BioEdit (Hall, 2001) se ejecutó el alineamiento múltiple de las secuencias, mediante el algoritmo Clustal W. La construcción del árbol filogenético se llevó a cabo con

el software MEGAX (Kumar *et al.*, 2018) mediante el método de Máxima Verosimilitud con base en el modelo Tamura-Nei, y los soportes de los nodos se determinaron con 1,000 repeticiones de bootstrap. Por último, se realizó la edición del árbol filogenético en el programa Tree of Life (iTOL): <https://itol.embl.de/> (Letunic y Bork, 2016).

7.8 Análisis de datos y estadísticos

El análisis de datos se llevó a cabo en el software RStudio.

Para determinar si la secuenciación tuvo la suficiente profundidad para poder detectar a la mayoría de los sublinajes UCYN-A en cada muestra, se realizaron curvas de rarefacción con la paquetería iNEXT (Hsieh *et al.*, 2016) de las ASVs observadas contra la profundidad de secuenciación de las diferentes muestras. Para los análisis de diversidad alfa del gen *nifH* se calcularon diferentes métricas (Chao1, Shannon-Weaver, Simpson y Faith) con la paquetería Vegan (Oksanen *et al.*, 2020) usando la tabla de ASVs previamente estandarizada (rarificada) en QIIME 2. Con la paquetería ggplot2 se realizaron gráficas de barras en las que se resaltan las muestras por crucero de cada métrica calculada, así como diagramas de caja y bigote para comparar ambos cruceros por profundidad.

Para el análisis de la diversidad beta se generó una matriz de disimilitud del índice de Bray-Curtis con vegan y se generó un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) con ggplot2. Para determinar las variables ambientales y los nutrientes que influyeron en la distribución de UCYN-A, los datos se normalizaron para un promedio igual a 0 y desviación estándar de 1, y se ajustaron a la gráfica NMDS. Además, se realizó un análisis de redundancia (RDA) para el cual la tabla de frecuencias de ASVs rarificada fue transformada por Hellinger, mientras que las variables ambientales y los nutrientes se transformaron logarítmicamente. Para determinar las variables redundantes, se usó el índice de criterio de información de Akaike (AIC) mediante 1000 permutaciones, donde se determinó el mejor modelo que explicó la distribución de las muestras sobre el efecto ambiental.

Se aplicaron pruebas de ANOSIM utilizando vegan para comparar las muestras por estaciones, profundidades y años de muestreo a partir de las medidas de distancia de Bray-Curtis, con el fin de probar si existe una diferencia significativa en la composición de la comunidad entre los grupos de muestras. Por otra parte, se realizó una prueba de mantel con

vegan para determinar si hay una correlación entre la matriz de abundancia de Bray-Curtis y la matriz de distancia geográfica entre las estaciones de muestreo, generada con la distancia de Haversine.

Se elaboró un mapa de calor de la distribución de las ASVs representativos más abundantes de cada oligotipo encontrado usando las paqueterías stats, gplots y Heatplus (Ploner, 2018; Bolker *et al.*, 2020). Se utilizó la distancia de disimilitud de Bray-Curtis y el algoritmo de agrupamiento jerárquico ward D2, el cual crea grupos con mínima varianza dentro de los grupos. Finalmente, se realizaron diagramas de Venn para analizar las ASVs compartidos entre las profundidades y estaciones de muestreo con la paquetería VennDiagram (Chenn, 2018).

8. RESULTADOS

8.1 Variables oceanográficas y nutrientes en los cruceros MAZ IV y MAZ V

a) Condiciones climáticas

Los dos años de muestreo cubrieron una transición climática de un año frío en 2018 con un evento débil de La Niña (anomalía de la TSM en el bimestre abril-mayo) a un año cálido en 2019 con un evento débil de El Niño (Figura 4) en donde hubo un aumento de la TSM en el bimestre marzo a abril en el ETNP según el MEI.v2 (<https://psl.noaa.gov/enso/mei/>).

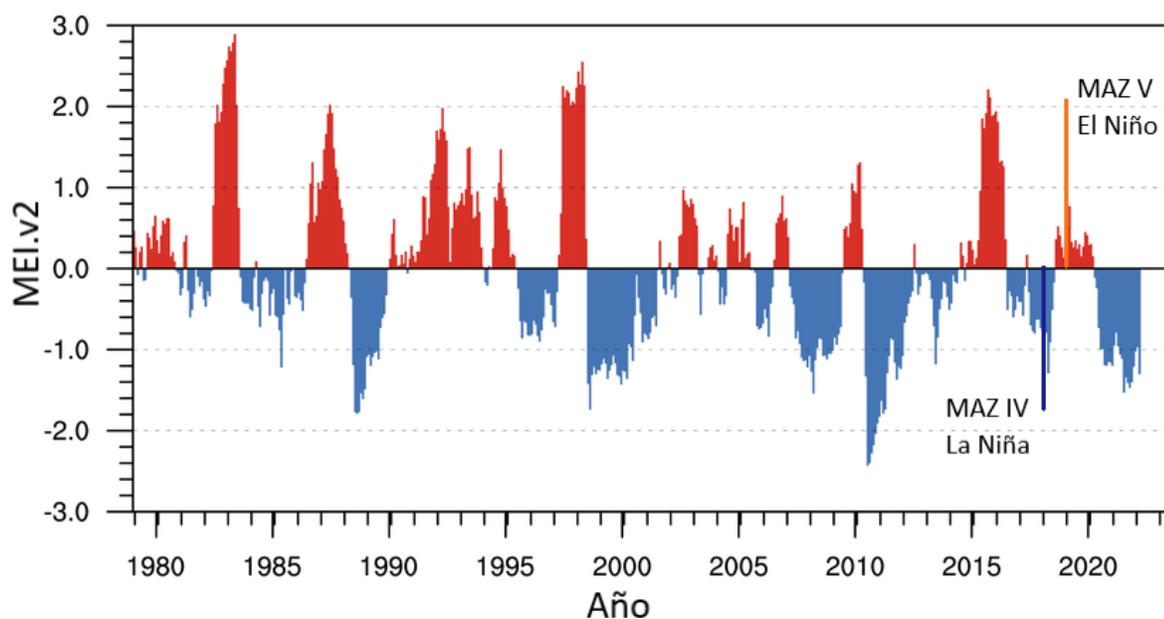


Figura 4. Evolución temporal de los eventos El Niño y La Niña indicados por el MEI.v2. La Niña= color azul y El Niño= color rojo.

b) Características de las masas de agua

Los diagramas T-S indicaron la presencia de cuatro masas de agua en el área de estudio (Figura 5) con diferente proporción en cada crucero, de acuerdo con las definiciones de la Ecuación Termodinámica del Agua de Mar (TEOS-10), siguiendo a Portela *et al.*, (2016):

1) Agua del Golfo de California (GCW, caracterizada por una temperatura $> 12\text{ }^{\circ}\text{C}$ y salinidad absoluta $> 35.1\text{ g kg}^{-1}$), la cual mostró menor abundancia en el crucero MAZ IV, abarcando una capa muy somera $\leq 20\text{ m}$ de profundidad en las estaciones oceánicas con una concentración promedio de $210\text{ }\mu\text{M}$ de oxígeno, y una temperatura de $23\text{ a }24\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cabe mencionar que esta masa de agua no estuvo presente en las estaciones costera y media del mismo crucero. En cambio, en el crucero MAZ V se observó una mayor proporción de esta masa de agua (hasta $22\text{ y }80\text{ m}$ de profundidad en las estaciones costera y la más oceánica, respectivamente), con una temperatura promedio de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ en todas las estaciones y una concentración promedio de $220\text{ }\mu\text{M}$ en la estación costera y $150\text{ }\mu\text{M}$ en las estaciones oceánicas.

- 2) Agua de transición (TrW), originada por la mezcla de dos masas de agua, GCW y el agua Tropical Superficial (TSW) que influyó principalmente en el crucero MAZ V, con una temperatura de 20 a 24 °C y salinidad absoluta entre 34.5 y 35.1 g kg⁻¹.
- 3) Agua Subtropical Subsuperficial (StSsW, caracterizada por una temperatura entre 9 y 18 °C, salinidad absoluta entre 34.6 y 35.1 g kg⁻¹), la cual se extendió por debajo del TrW en ambos cruceros. La StSsW se detectó en el crucero MAZ IV a los 30 y 47 m de profundidad en la estación media y la más oceánica, respectivamente hasta los 95 y 452 m de profundidad en las mismas estaciones, con una concentración de oxígeno entre 0.3 y 120 μM. En el crucero MAZ V esta masa de agua se encontró desde 48 y 82 m de profundidad en la estación media V.M2 y la más oceánica, respectivamente, hasta los 93 y 438 m de profundidad en las mismas estaciones, con valores de oxígeno entre 1.5 y 160 μM.
- 4) Agua intermedia del Pacífico (PIW, temperatura entre 4 y 9 °C, salinidad absoluta entre 34.6 y 34.9 g kg⁻¹), la cual se encontró por debajo de los 400 m de profundidad hasta el fondo de las estaciones más oceánicas en ambos cruceros, con concentraciones más bajas de oxígeno en MAZ IV (0.3 a 0.4 μM) en comparación con MAZ V (1.1 a 1.4 μM).

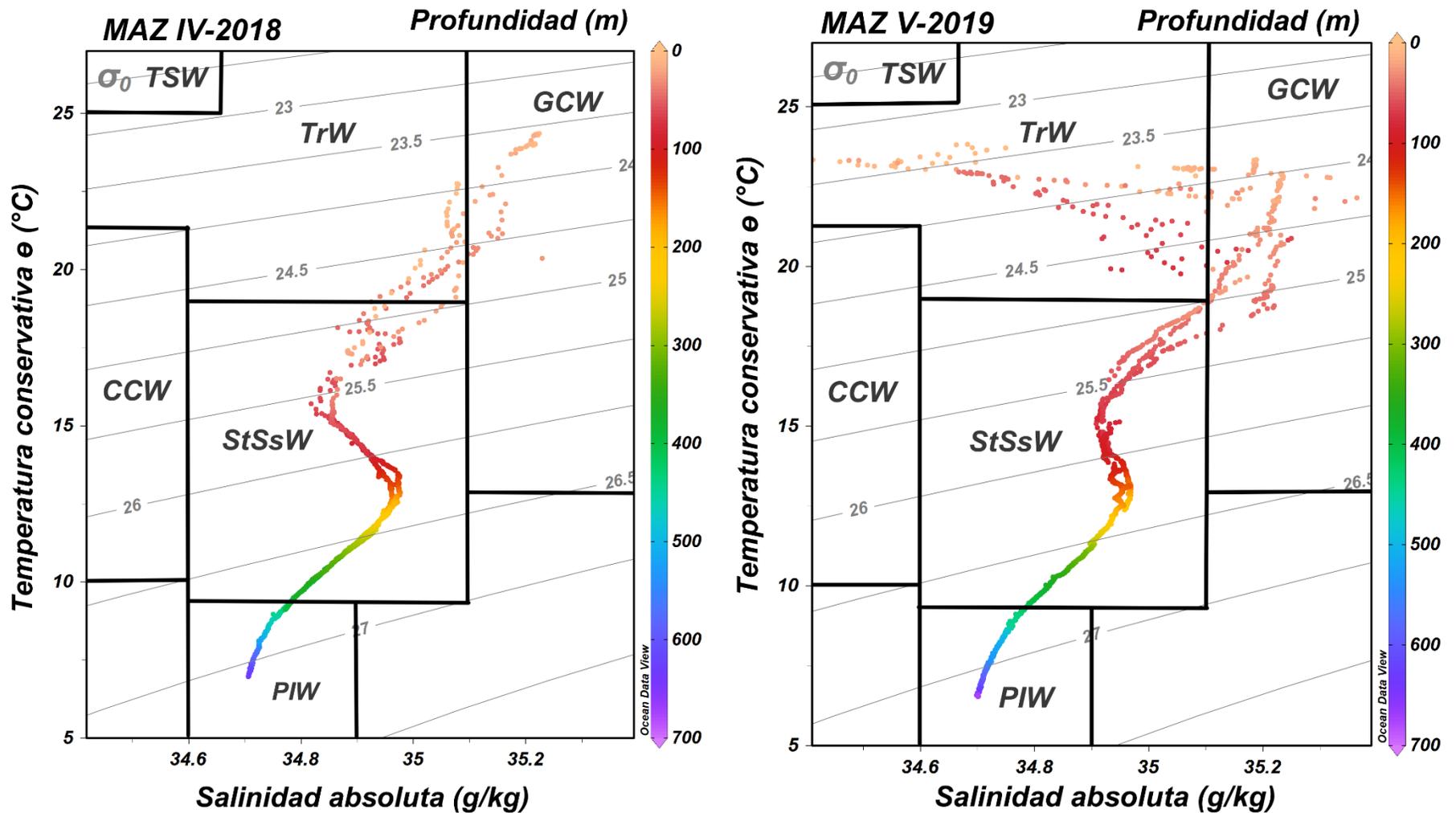


Figura 5. Diagramas T-S de ambos cruceros frente al puerto de Mazatlán en el Pacífico mexicano con base en la clasificación propuesta por Portela *et al.* (2016). Abreviaturas: TSW: agua Tropical Superficial, GCW: agua del Golfo de California, TrW: agua de transición, CCW: agua de la corriente de California, StSsW: agua Subtropical Subsuperficial y PIW: agua intermedia del Pacífico.

c) Características hidrográficas

Con respecto a las secciones verticales de los parámetros oceanográficos (Figura 6), en ambos cruceros la temperatura fue mayor en la superficie (20-24 °C) y disminuyó con la profundidad hasta 17 y 22 °C en la estación costera de los cruceros MAZ IV y MAZ V, respectivamente, mientras que, en las estaciones más oceánicas, la temperatura disminuyó hasta 7 °C (MAZ IV) y 6.6 °C (MAZ V). Cabe mencionar que en la estación costera V.C del crucero MAZ V la columna de agua estuvo mezclada, por lo que la temperatura fue relativamente constante (22-23 °C), el O₂ estuvo sobresaturado en toda la columna de agua, es decir no hubo ZMO, y la concentración de clorofila *a* aumentó con la profundidad, alcanzando el valor más alto en el fondo de esta estación (1.6 mg/m³).

El O₂ disminuyó con la profundidad en todas las estaciones en ambos cruceros (excepto en la estación costera en MAZ V), de manera que el inicio de la ZMO (considerando que la ZMO comienza a partir de una concentración < 20 µM según Paulmier y Ruiz-Pino, 2009) se observó a 17 m de profundidad en la estación costera (IV.C) y a 68 m de profundidad en la estación más oceánica (IV.O2) en el crucero MAZ IV. En el crucero MAZ V, el inicio de la ZMO se observó a 98 m de profundidad en la estación más oceánica (V.O2). Por debajo de estas profundidades los valores de O₂ fueron disminuyendo hasta alcanzar el límite de detección del equipo ($\leq 1 \mu\text{M}$), aproximadamente a 97 m de profundidad en la estación más oceánica (IV.O2) del crucero MAZ IV y hasta 1.1 µM en el fondo de la estación más oceánica (V.O2) en MAZ V.

La clorofila *a* presentó los valores más altos (6.2 mg/m³) en la estación costera IV.C del crucero MAZ IV a los 10 m de profundidad, mientras que en la estación más oceánica (IV.O2) se observaron dos picos de clorofila *a* (2 mg/m³) a 30 y a 45 m de profundidad. En el crucero MAZ V, en la estación media V.M2 se observó el valor más alto de clorofila *a* (2 mg/m³) a 43 m de profundidad y a 38 m de profundidad en la estación más oceánica V.O2 (1.5 mg/m³).

En general, la salinidad fue mayor en los primeros 20 m de profundidad (35 g/kg¹) en todas las estaciones en ambos cruceros y disminuyó conforme aumentó la profundidad, hasta 34.7 y 34.9 g/kg¹ en los cruceros MAZ IV y MAZ V, respectivamente en la estación costera, y hasta 34.5 g/kg¹ en las estaciones más oceánicas de ambos cruceros.

MAZ IV (2018)

MAZ V (2019)

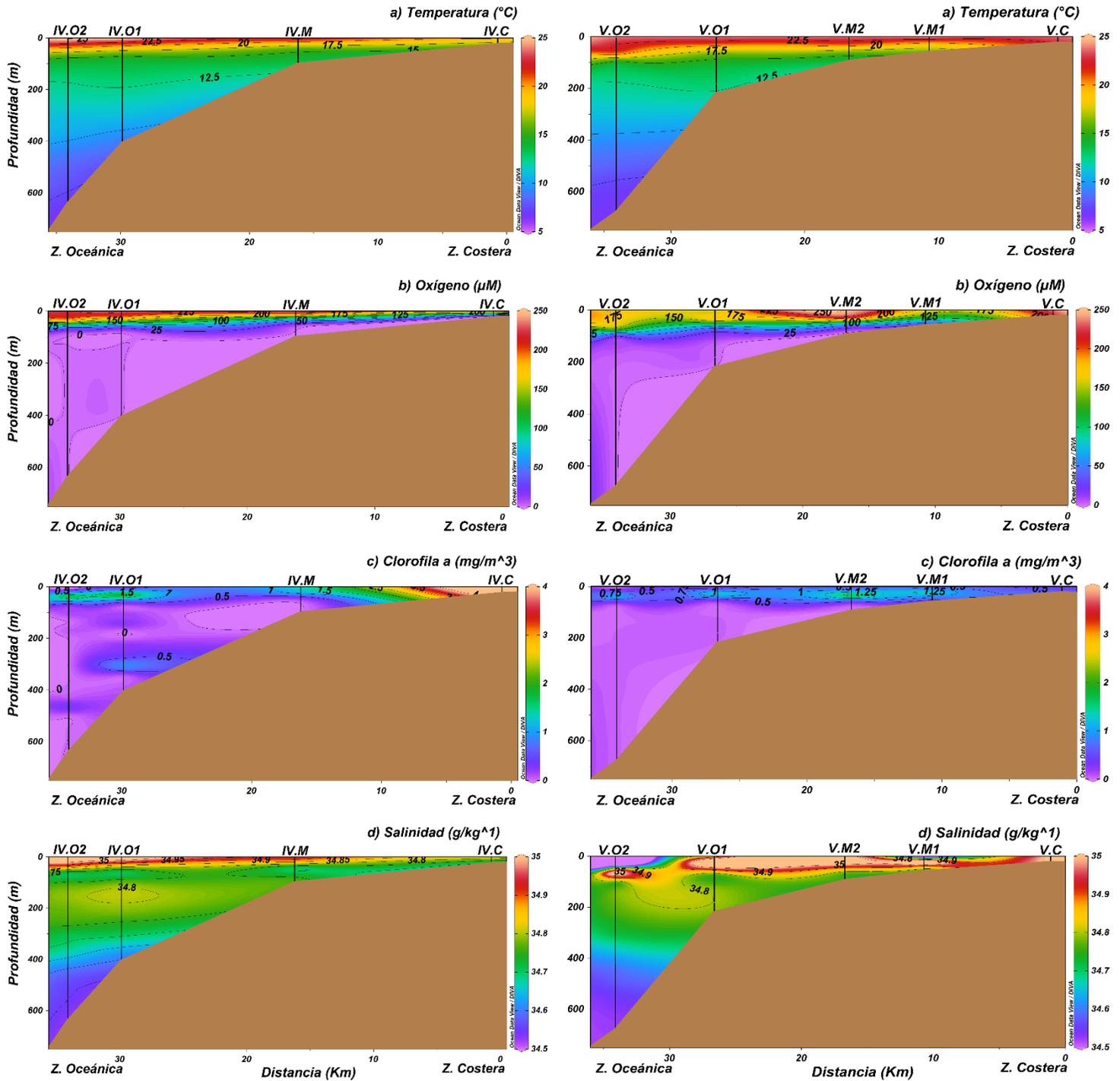


Figura 6. Secciones verticales de los parámetros hidrográficos en los crueros MAZ IV (paneles de la izquierda) y MAZ V (paneles de la derecha): a) temperatura ($^{\circ}\text{C}$), b) oxígeno (μM), c) clorofila *a* (mg/m^3) y d) salinidad ($\text{g}/\text{kg}^{\wedge}1$). Abreviaturas: C = estación costera, M = estaciones medias 1 y 2, O = estaciones oceánicas 1 y 2. El eje horizontal indica la distancia de la costa hacia el océano (Km), mientras que el eje vertical indica la profundidad de la columna de agua (m).

d) Características bioquímicas del agua

En general, las concentraciones de NID (NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^-) aumentaron conforme incrementó la profundidad y fueron mayores en todas las estaciones del crucero MAZ IV en comparación con el crucero MAZ V (Figura 7).

La mayor concentración de NH_4^+ ($6.2 \mu\text{M}$) en la estación costera (IV.C) de MAZ IV se encontró en el fondo, mientras que en la estación más oceánica (IV.O2) se encontró el valor mínimo ($0.01 \mu\text{M}$) a 250 m de profundidad. En el crucero MAZ V, se observaron los valores más altos en el fondo de las estaciones oceánicas, $3.7 \mu\text{M}$ (V.O1) y $3.8 \mu\text{M}$ (V.O2).

En cuanto a las concentraciones de NO_2^- , en el crucero MAZ IV se encontró el máximo superficial característico de este nutriente a 250 m de profundidad ($1.4 \mu\text{M}$ en IV.O1 y $1.9 \mu\text{M}$ en IV.O2) en las estaciones oceánicas, que se extendió hasta la costa, alcanzando $1.5 \mu\text{M}$ a 20 m de profundidad en la estación costera (IV.C). Para el crucero MAZ V, solamente se observó este máximo de NO_2^- en la estación oceánica V.O1, donde alcanzó una concentración máxima de $1.3 \mu\text{M}$ a 213 m de profundidad.

Los valores de NO_3^- en la superficie de la estación costera fueron de $2.3 \mu\text{M}$ (MAZ IV) y $0.06 \mu\text{M}$ (MAZ V), aumentando con la profundidad hasta alcanzar valores de $7 \mu\text{M}$ (MAZ IV) y $0.4 \mu\text{M}$ (MAZ V). Los valores máximos de NO_3^- en las estaciones más oceánicas (O2) en ambos cruceros se encontraron en el fondo ($36 \mu\text{M}$ en MAZ IV y $44.6 \mu\text{M}$ en MAZ V). Finalmente, los valores promedio de PO_4^{3-} en la superficie de la estación costera fueron $2.3 \mu\text{M}$ en MAZ IV y $0.6 \mu\text{M}$ en MAZ V, mientras que en la superficie de la estación más oceánica O2 fueron de $0.75 \mu\text{M}$ en MAZ IV y $0.47 \mu\text{M}$ en MAZ V. En todas las estaciones, las concentraciones de PO_4^{3-} fueron mayores conforme aumentó la profundidad, con valores máximos en el fondo de las estaciones oceánicas (3.2 y $3 \mu\text{M}$ en los cruceros MAZ IV y MAZ V, respectivamente).

MAZ IV (2018)

MAZ V (2019)

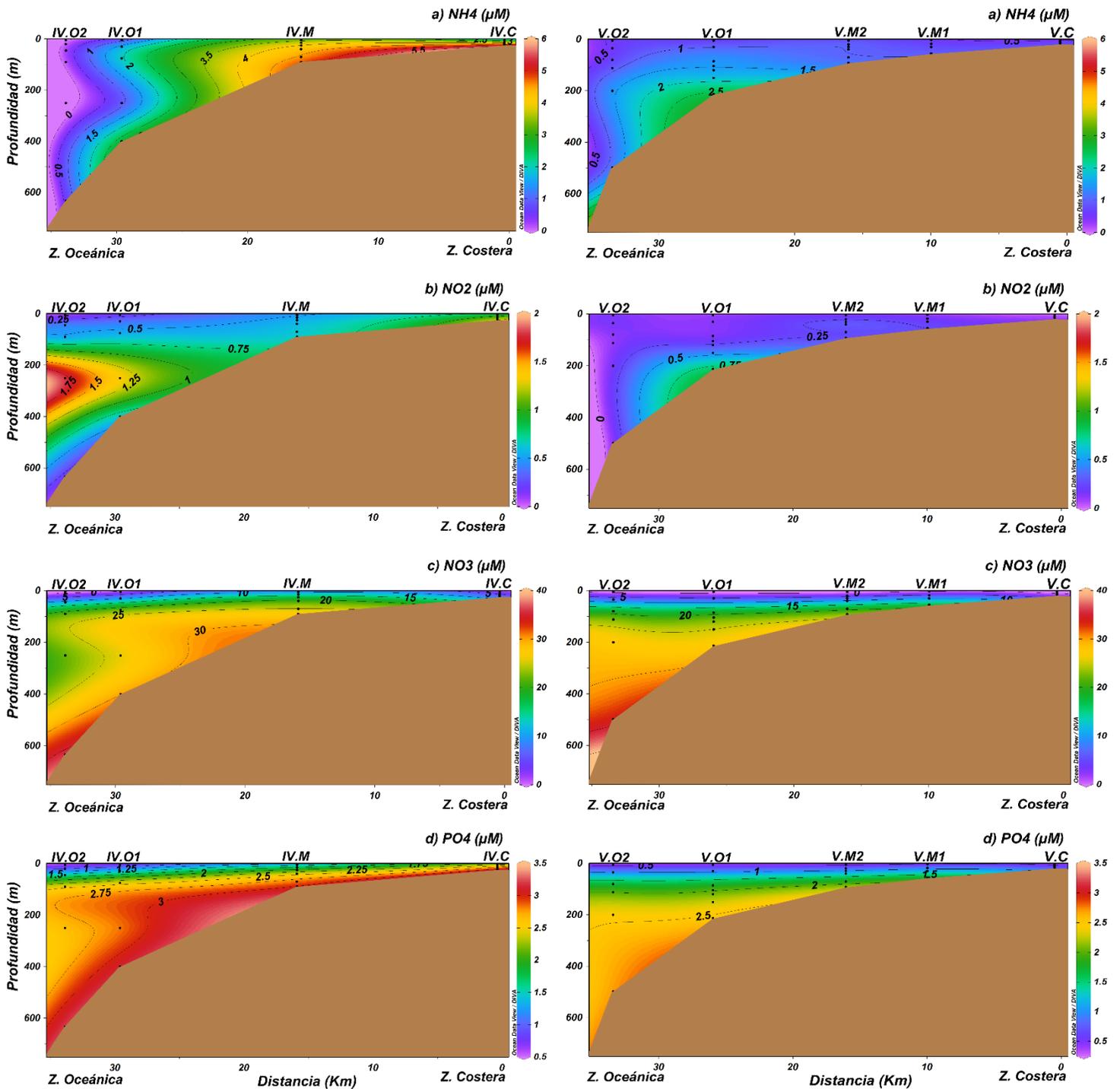


Figura 7. Secciones verticales de la concentración de los nutrientes (μM) en los cruces MAZ IV (paneles de la izquierda) y MAZ V (paneles de la derecha): a) NH_4^+ , b) NO_2^- , c) NO_3^- , d) PO_4^{3-} . Abreviaturas: C = estación costera, M = estaciones medias 1 y 2, O = estaciones oceánicas 1 y 2. El eje horizontal indica la distancia de la costa hacia el océano (Km), mientras que el eje vertical indica la profundidad de la columna de agua (m).

8.2 Distribución y diversidad de UCYN-A en los cruceros MAZ IV y MAZ V

a) Construcción de las bibliotecas del gen *nifH* y obtención de ASVs

Se logró amplificar el gen *nifH* de UCYN-A en las muestras de superficie, PMC y fondo de la estación costera (IV.C) del crucero MAZ IV, mientras que para las estaciones restantes (IV.M, IV.O1 y IV.O2) sólo se obtuvo buena amplificación de las muestras superficiales. La amplificación obtenida fue muy escasa en las muestras del PMC, por lo cual no fue posible obtener suficiente producto de PCR purificado para la secuenciación. Con respecto al resto de las profundidades (final de la oxiclina, ZMO y fondo), no se obtuvo amplificación en ninguna de estas tres muestras.

En relación con el crucero MAZ V, se logró amplificar las muestras de las profundidades, superficial, zona mezclada y fondo de la estación costera (V.C). Para la estación media (V.M2), se obtuvo buena amplificación para secuenciación de la superficie y PMC. En cuanto a la estación más oceánica V.O2, se obtuvo una amplificación muy deficiente de la muestra superficial, por lo que no fue posible obtener suficiente producto de PCR purificado para la secuenciación. Respecto al resto de las profundidades (PMC, final de la oxiclina, ZMO y fondo), no se obtuvo amplificación en las estaciones media V.M2 y la más oceánica V.O2 (Tabla S1).

Se obtuvieron 9,823,166 lecturas del gen *nifH* UCYN-A de extremos emparejados en las 11 muestras secuenciadas: seis del crucero MAZ IV y cinco de MAZ V (Figura S1). Después de analizar los resultados obtenidos con el algoritmo DADA2 para las secuencias de un solo extremo y de ambos extremos (single-end y paired-end por sus siglas en inglés) se observó que se perdieron muchas lecturas al unir las secuencias paired-end. Por lo tanto, se decidió obtener las ASVs usando solo las secuencias single-end del extremo forward con un nivel de corte a 20 pb y 275 pb. Se obtuvieron un total de 1,383 ASVs en 3, 868,894 secuencias con un tamaño de fragmento de 255 pb.

b) Asignación taxonómica y filogenia del gen *nifH* de UCYN-A

Con la primera base de datos del gen *nifH* se lograron asignar 1,343 ASVs de un total de 1,383 ASVs: 665 secuencias se asignaron como *Ca. Atelocyanobacterium thalassa* (UCYN-A), 678 secuencias se asignaron hasta Bacteria, 26 se asignaron a otro Phylum (6 Firmicutes, 2 Proteobacteria, 18 Elusimicrobia) y 14 secuencias no fueron asignadas a ninguna secuencia *nifH* de referencia. Las secuencias asignadas a otro Phylum o no asignadas se eliminaron de la base de datos, mientras que las secuencias asignadas hasta Bacteria se clasificaron como “otros”.

Las 665 secuencias asignadas a UCYN-A fueron comparadas con una base de datos de referencia específica de UCYN-A, asignándose en su mayoría al sublinaje UCYN-A2. Se encontraron 12 de 12 oligotipos de UCYN-A2 según la base de datos de referencia Turk-Kubo *et al.* (2017) y un único oligotipo del sublinaje UCYN-A1 (de 20 oligotipos pertenecientes a este sublinaje). Por otro lado, se realizó un análisis de oligotipificación para una resolución filogenética más fina. Sin embargo, no fue posible realizar el oligotipado en estas secuencias, es decir, no se pudieron observar los 13 sitios variables que reporta Turk-Kubo *et al.* (2017) para poder descomponer las secuencias en oligotipos, ya que la mayoría de las secuencias correspondieron a un único oligotipo del sublinaje UCYN-A2.

Se realizaron dos gráficas de barras basadas en los distintos oligotipos encontrados de los sublinajes UCYN-A1 y A2. En la primera se representan los 13 oligotipos pertenecientes a algún sublinaje UCYN-A y las secuencias clasificadas como “otros” (Figura S2), y en la segunda se representa únicamente a las 665 secuencias de ASVs asignadas a alguno de los oligotipos UCYN-A (Figura 8). En esta última gráfica, se observa que la muestra del PMC de la estación costera del crucero MAZ IV (IV.C.PMC) obtuvo el menor número de oligotipos (siete oligotipos), mientras que las muestras de fondo costera (IV.C.F), de superficie de la estación más oceánica (IV.O2.S) del MAZ IV y la muestra del PMC de la estación media de MAZ V (V.M2.PMC) obtuvieron el mayor número de oligotipos (13 oligotipos). Por otra parte, en el crucero MAZ IV estuvieron presentes los 13 oligotipos encontrados, en contraste con el crucero MAZ V, en donde el oligotipo 1 (UCYN-A1) estuvo ausente. Cabe mencionar que este oligotipo estuvo presente únicamente en las muestras

superficiales de las estaciones oceánicas (IV.O1.S y IV.O2.S) y media (IV.M.S) del crucero MAZ IV.

El oligotipo 3 perteneciente al sublinaje UCYN-A2 se encontró en todas las estaciones de ambos cruceros y fue muy dominante en todas las muestras, representando el 96.3 % de la abundancia relativa de las secuencias de UCYN-A, mientras que el oligotipo 40 perteneciente a UCYN-A2 presentó la menor abundancia relativa (0.05 %). Asimismo, se observa que el 1 % de las secuencias no fueron asignadas a ningún sublinaje, pero si al linaje general UCYN-A.

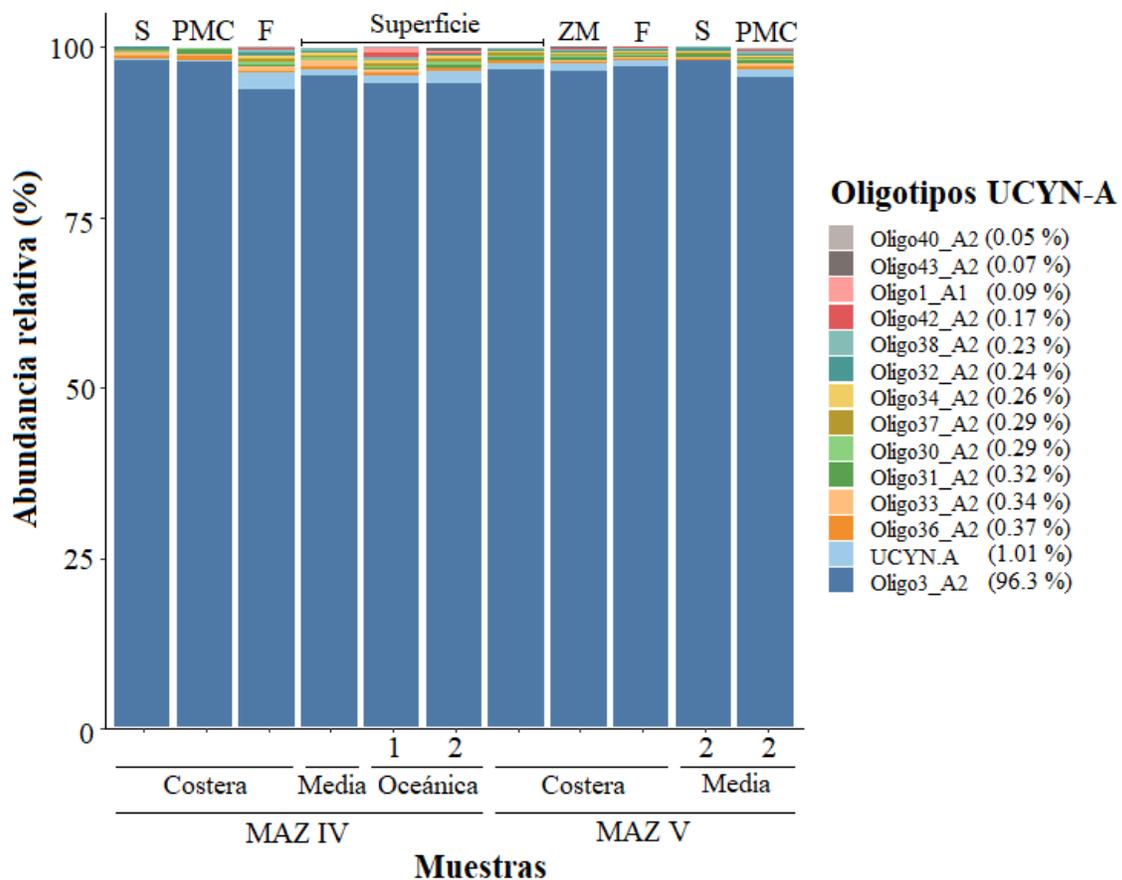


Figura 8. Abundancia relativa de los sublinajes UCYN-A presentes en las 11 muestras. En el eje x se denotan los distintos cruceros= MAZ IV o MAZ V, las estaciones= costera, media y oceánica, y el número de estación. Arriba de cada barra se señala la profundidad: S= superficie, PMC= primer máximo de clorofila, F= fondo y ZM= zona mezclada.

En los dos árboles filogenéticos construidos a partir de las ASVs representativas más abundantes de todos los oligotipos encontrados de UCYN-A se observa que esta comunidad estuvo compuesta principalmente por el sublinaje UCYN-A2, con 12 oligotipos pertenecientes a este sublinaje, y un oligotipo (oligotipo 1) del sublinaje UCYN-A1.

En uno de los árboles se representa la presencia o ausencia de cada ASV en las 11 muestras (Figura S3), en donde se observa que el crucero MAZ IV tuvo más ASVs únicos que el crucero MAZ V. Los oligotipos 3 (el más dominante), oligotipo 34 y oligotipo 36 del sublinaje UCYN-A2 fueron los únicos que se encontraron en todas las muestras de ambos cruceros. Por otro lado, en la muestra superficial de la estación costera del crucero MAZ V (V.C.S) sólo se encontraron las ASVs 673 (oligotipo 37), 1013 (oligotipo 38), 1042 (oligotipo 32) y 737 (oligotipo 34) del mismo sublinaje. La mayoría de las ASVs correspondientes al oligotipo 36 fueron únicas para las muestras costeras (superficie, PMC y fondo) del MAZ IV. Asimismo, las ASVs 616 (oligotipo 42) y 1184 (oligotipo 30) únicamente se encontraron en el PMC de la estación media (V.M2.PMC) del crucero MAZ V. En el PMC de la estación costera del crucero MAZ IV (IV.C.PMC) sólo se encontraron seis oligotipos (3, 30, 31, 33, 34, 36) del sublinaje UCYN-A2, mientras que en las muestras de fondo de la estación costera de MAZ IV (IV.C.F) y del PMC de la estación media de MAZ V (V.M2.PMC) se encontraron los 12 oligotipos del sublinaje UCYN-A2. Por otro lado, las ASVs relacionadas al oligotipo 1 del sublinaje UCYN-A1 solamente se hallaron en la superficie de las estaciones media y oceánicas del crucero MAZ IV.

En el árbol filogenético en donde se representa la abundancia relativa de cada ASV en las muestras secuenciadas (Figura 9) se observa que las ASVs 1, 5, 6 y 9 correspondientes al oligotipo 3 del sublinaje UCYN-A2 presentaron una abundancia muy similar en todas las muestras y se agruparon con los oligotipos 33 y 38.

Las ASVs 893 (oligotipo 32), 501 (oligotipo 33), 721 (oligotipo 36), 1286 (oligotipo 38) y 724 (oligotipo 43) fueron únicas en la muestra del fondo de la estación costera del crucero MAZ IV (IV.C.F), en contraste con la mayoría de las ASVs presentes en la muestra de fondo de la estación costera del crucero MAZ V (V.C.F), las cuales presentaron una abundancia similar con las muestras de la superficie y la zona mezclada de la estación costera del mismo crucero. Finalmente, las ASVs 954 y 1096 (oligotipo 1) del sublinaje UCYN-A1 fueron únicas en las muestras de la superficie de las estaciones media IV.M.S y la más oceánica

IV.O2.S del crucero MAZ IV, respectivamente. Cabe mencionar que la ASV 218 también perteneciente al oligotipo 1 se encontró en la superficie de las estaciones media (IV.M.S) y oceánicas (IV.O1.S y IV.O2.S) del crucero MAZ IV, pero presentó mayor abundancia relativa (70 %) en la muestra superficial de la estación oceánica IV.O1.S.

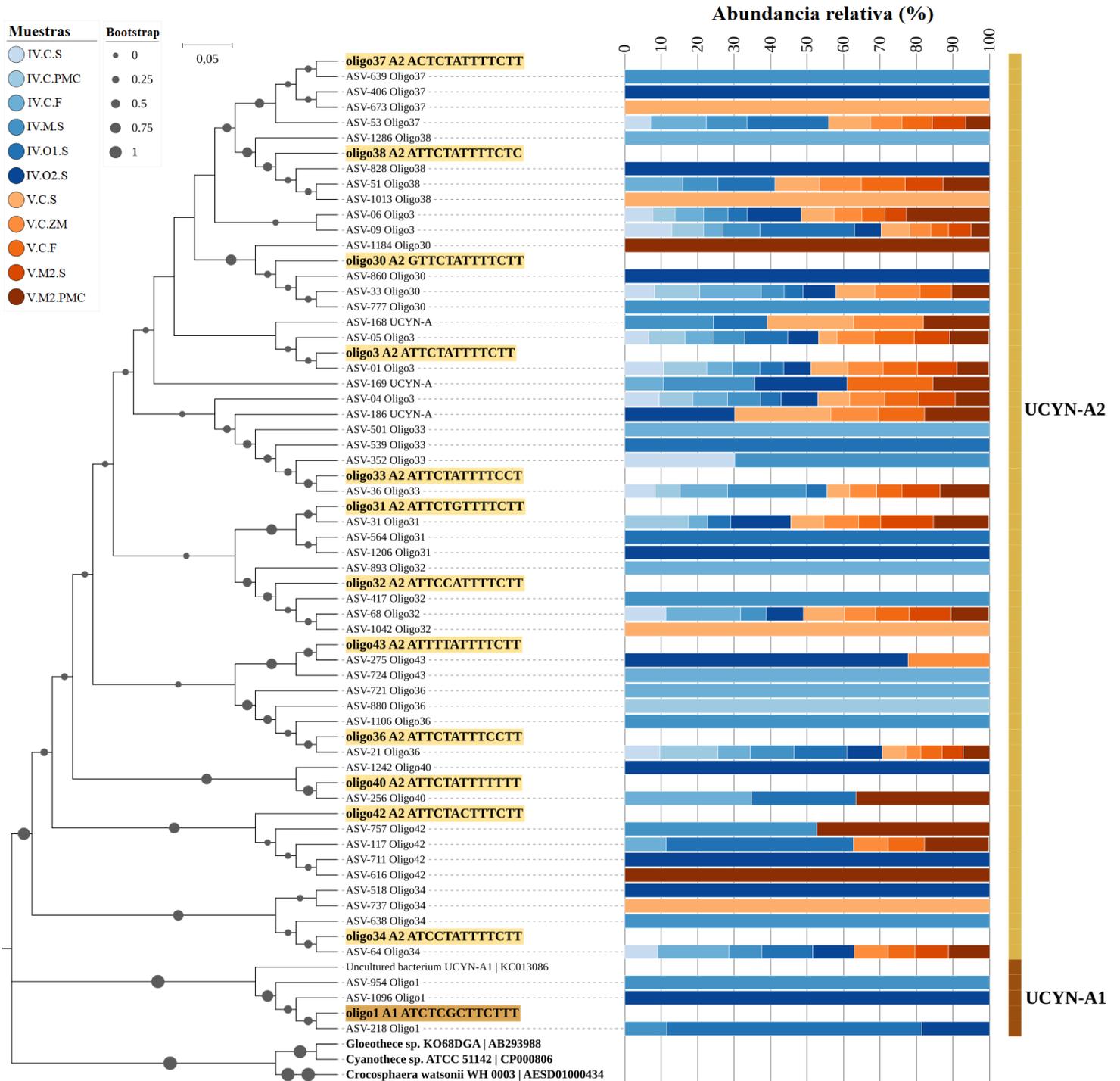


Figura 9. Árbol filogenético de los 50 ASVs representantes más abundantes de UCYN-A, obtenido por el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei. El valor de bootstrap aparece en los nodos con un círculo gris. A la derecha, los colores en la gráfica de barras horizontales denotan la abundancia relativa de cada ASV en las 11 muestras. El color de las barras verticales y de las etiquetas indica el sublinaje correspondiente: Color arena para UCYN-A2 y café para UCYN-A1. Asimismo, el color de las etiquetas resaltadas en el árbol indica los diferentes oligotipos de cada sublinaje. Se usaron 13 secuencias de oligotipos de referencia y 3 de referencia de cianobacterias unicelulares estrechamente relacionadas (UCYN-B, UCYN-C).

c) Análisis de diversidad alfa de la comunidad UCYN-A

El análisis de rarefacción mostró que la profundidad de secuenciación fue buena y suficiente para evaluar la diversidad del clado UCYN-A, ya que en todas las muestras hay una estabilización del número de ASVs a partir de las 12,500 secuencias (Figura S4). Para los análisis de diversidad, los datos se rarificaron al menor número de frecuencia por muestra, que fue de 234,869 lecturas, obteniéndose 1,340 ASVs.

En general, la diversidad alfa del gen *nifH* de UCYN-A fue mayor en el crucero MAZ IV en comparación con el crucero MAZ V. Particularmente, la muestra de fondo de la estación costera (IV.C.F) y la muestra superficial de la estación oceánica IV.O1.S del MAZ IV presentaron una mayor diversidad, a diferencia de la muestra del PMC de la estación costera (IV.C.PMC) que tuvo la menor diversidad en el mismo crucero. Por otro lado, en el crucero MAZ V la muestra del PMC de la estación media (V.M2.PMC) fue la más diversa, mientras que la muestra superficial de la estación media (V.M2.S) tuvo la menor diversidad. En particular, las muestras de superficie y PMC-ZM de la estación costera fueron más diversas en el crucero MAZ V en comparación con el MAZ IV.

En el crucero MAZ IV, el índice de Chao1 indicó una mayor riqueza en la muestra de fondo de la estación costera (439), mientras que la menor riqueza (104) se encontró en el PMC de la estación costera del mismo crucero. Por otro lado, en el crucero MAZ V, la muestra del PMC de la estación media (V.M2.PMC) presentó la mayor riqueza (312) y la muestra de superficie de la estación media (V.M2.S) la menor riqueza (99). Cabe destacar, que la riqueza entre la superficie y la zona mezclada de la estación costera del crucero MAZ V, en donde la columna de agua se encontró mezclada, fue similar (Figura 10).

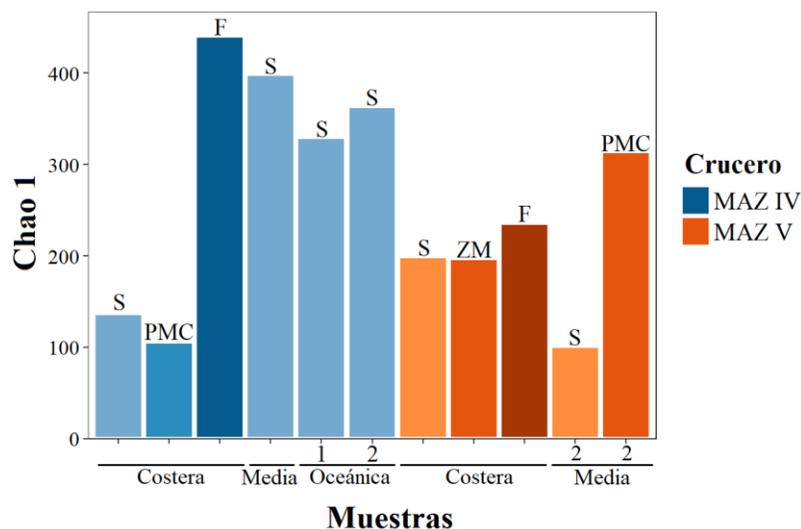


Figura 10. Índice de Chao1. Las muestras se encuentran ordenadas por estación y profundidad (diferentes tonalidades de color), resaltadas por crucero (MAZ IV=Azul, MAZ V=Naranja). En el eje x se denotan las estaciones: costera, media y oceánica, y el número de estación. Arriba de cada barra se señala la profundidad: S= superficie, PMC= primer máximo de clorofila, F= fondo y ZM= zona mezclada.

Los valores del índice de Shannon-Weaver estuvieron entre 1.5 y 3.7 (Figura 11). Se encontró mayor diversidad en las muestras de fondo de la estación costera (IV.C.F) y superficial de la estación oceánica (IV.O1.S) del crucero MAZ IV. Por otra parte, en el crucero MAZ V se observó mayor diversidad en el PMC de la estación media (V.M2).

Las muestras del PMC de la estación costera y de la superficie de la estación media (V.M2) de los cruceros MAZ IV y MAZ V, respectivamente, tuvieron la menor diversidad.

Para el índice de Simpson, las muestras con mayor y menor dominancia fueron las mismas que para el índice de Shannon (Figura 11).

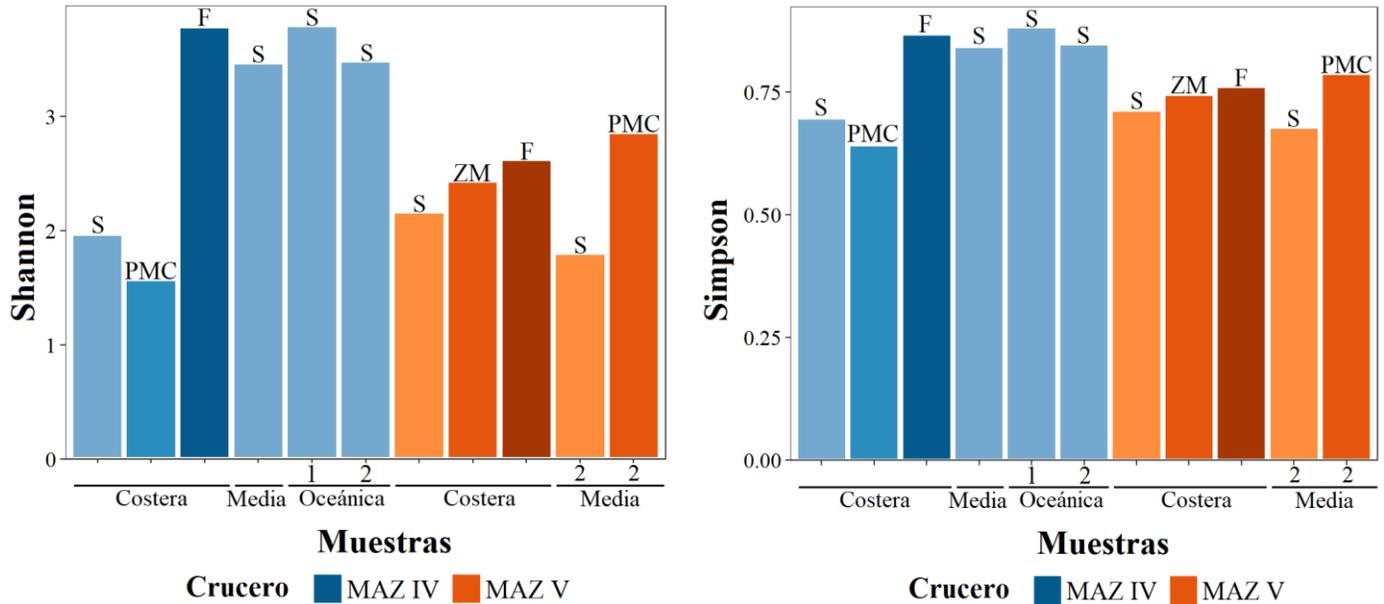


Figura 11. Análisis de diversidad alfa con los índices de Shannon-Weaver y Simpson. Las muestras se encuentran ordenadas por estación y profundidad (diferentes tonalidades de color), resaltadas por crucero (MAZ IV=Azul, MAZ V=Naranja). Etiquetas de abreviaturas: Véase figura 10.

Finalmente, el índice de diversidad filogenética de Faith mostró mayor diversidad en la superficie de la estación costera para ambos cruceros, seguida de las muestras superficiales de las estaciones oceánicas del crucero MAZ IV, y menor diversidad en las muestras de fondo costera y superficial de la estación media (V.M2.S) del crucero MAZ V (Figura 12).

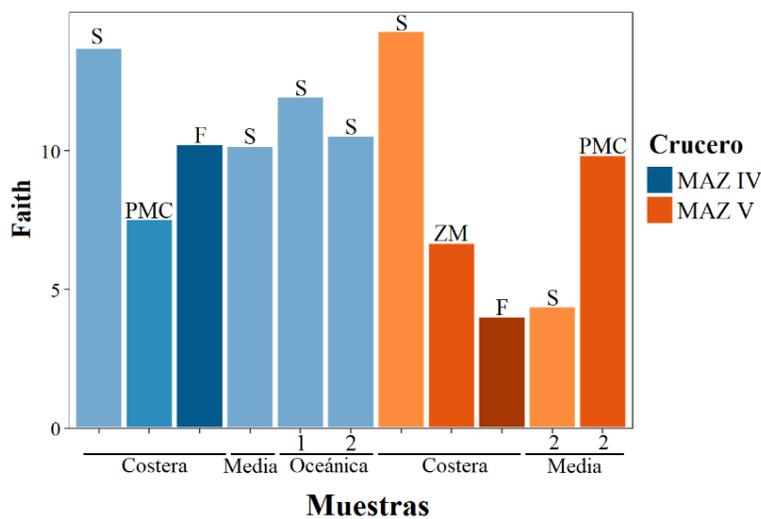


Figura 12. Análisis de diversidad filogenética con el índice de Faith. Las muestras se encuentran ordenadas por estación y profundidad (diferentes tonalidades de color), resaltadas por crucero (MAZ IV=Azul, MAZ V=Naranja). Etiquetas de abreviaturas: Véase figura 10.

En los diagramas de caja y bigote realizados para comparar la diversidad alfa en ambos cruceros por profundidad de muestreo, el número de muestras por profundidad fue desigual (Figura 13). Se encontró mayor diversidad en las estaciones superficiales del crucero MAZ IV (cuatro muestras) en comparación con MAZ V (dos muestras). En relación con las profundidades del PMC y de la zona mezclada, las dos muestras de MAZ V presentaron mayor diversidad que la única muestra de MAZ IV. Por último, en las dos muestras del fondo, se encontró menor diversidad en el crucero MAZ V.

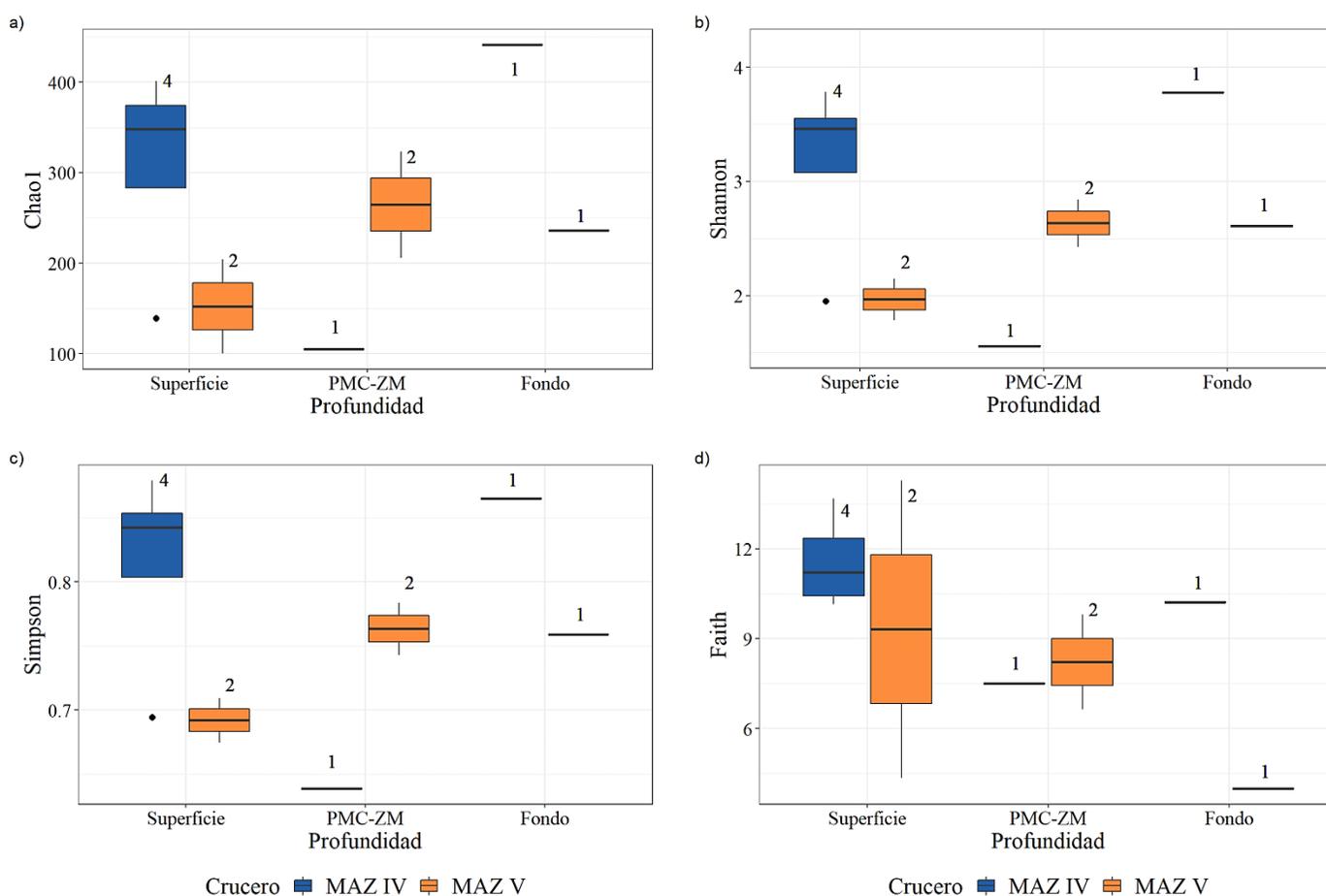


Figura 13. Diagramas de caja y bigote de diferentes índices de diversidad alfa por profundidad de muestreo para cada crucero. Las muestras se encuentran ordenadas por profundidad y resaltadas por crucero (MAZ IV=Azul, MAZ V=Naranja). Los números arriba de cada caja indican el número de muestras.

También se realizó una comparación de las muestras por profundidad de la estación costera en cada crucero para los diferentes índices de diversidad calculados, por ser la estación con mayor número de muestras (Figura S5). Para los índices de Chao1, Shannon-Weaver y Simpson se observó mayor diversidad en las muestras de fondo en ambos cruceros y menor diversidad en las muestras del PMC del crucero MAZ IV, mientras que en el MAZ V se observó menor diversidad en las muestras de la superficie. Con respecto al índice de Faith, se observó mayor diversidad en las muestras superficiales en ambos cruceros y menor diversidad en las muestras del PMC para MAZ IV y del fondo para MAZ V.

d) Análisis de diversidad beta: Relaciones de las variables ambientales y los nutrientes con la distribución de la comunidad UCYN-A

En la gráfica NMDS se observa que las condiciones ambientales de las zonas de muestreo tuvieron gran influencia en las diferencias en la distribución de la comunidad UCYN-A (Figura S6). La gráfica de ordenación mostró que las comunidades de las muestras superficiales de las estaciones oceánicas de MAZ IV están separadas de las demás muestras de ambos cruceros, lo que indica que son diferentes a las comunidades de las estaciones media y costera. Además, la comunidad de la muestra del fondo de la estación costera (IV.C.F), que se corresponde con la ZMO de MAZ IV, en donde la columna de agua estaba bien estratificada, se encuentra muy separada de la muestra del fondo de la misma estación de MAZ V, en donde la columna de agua estaba mezclada y oxigenada, lo que parece indicar que las comunidades UCYN-A del fondo costero de ambos cruceros tienen una estructura diferente, probablemente debido a las condiciones ambientales propias de cada crucero.

Un agrupamiento similar de distribución de las muestras se observó en la gráfica del RDA, mostrando diferencias en la estructura de la comunidad UCYN-A, principalmente entre las muestras superficiales de las estaciones costera y oceánicas (Figura 14). Además, el RDA mostró que la comunidad del fondo de la estación costera en MAZ IV tuvo una estructura muy diferente a las demás muestras y se correlacionó positivamente con el NO_3^- y negativamente con el O_2 . Por otro lado, la clorofila *a* estuvo negativamente correlacionada con la comunidad de tres muestras superficiales correspondientes a las estaciones media y oceánicas de MAZ IV.

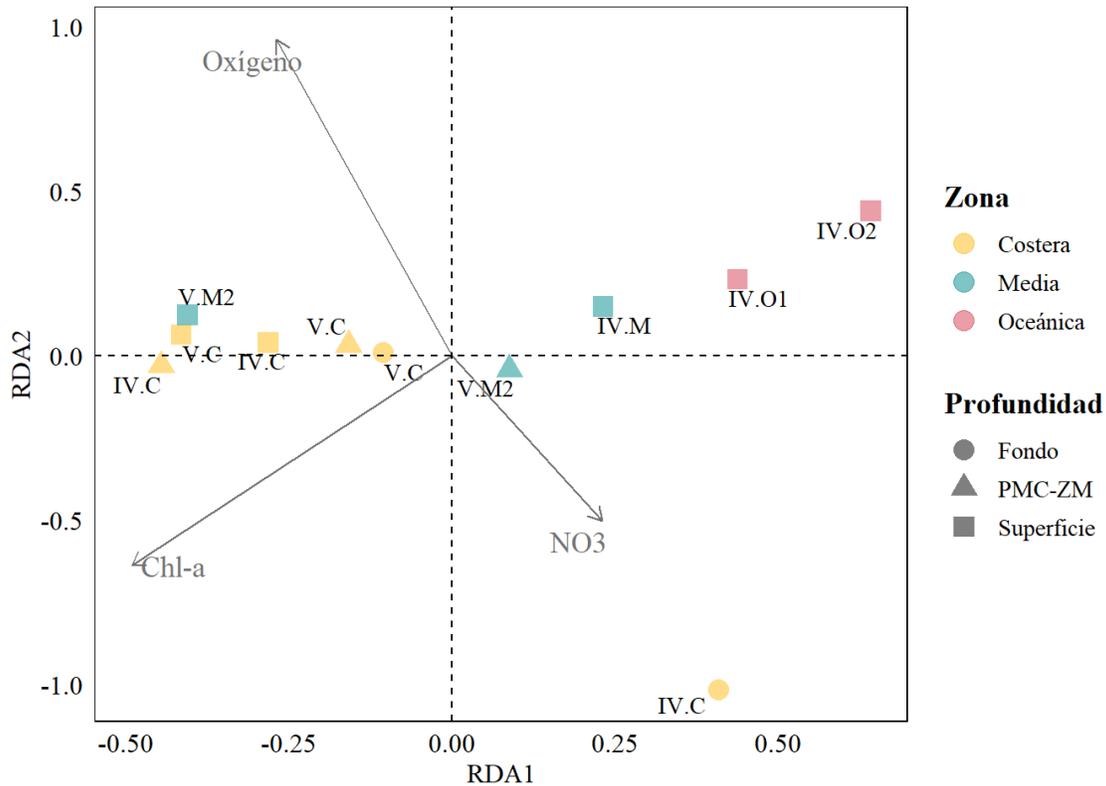


Figura 14. Gráfica de ordenación del RDA basado en la distribución de la abundancia de las ASVs del gen *nifH* en las once muestras (etiquetas), tres profundidades (símbolos) y tres diferentes estaciones de muestreo (colores). El biplot de correlación muestra la relación entre las muestras con las variables ambientales y los nutrientes. Abreviaturas: Chl-*a*: clorofila *a*, NO₃: nitrato, PMC-ZM: primer máximo de clorofila o zona mezclada; Etiquetas: IV o V = crucero MAZ IV o MAZ V; C = estación costera, M = estación media, O = estación oceánica.

Se realizó una prueba ANOSIM utilizando sólo las muestras de superficie de las estaciones costera, medias y oceánicas de ambos cruceros, dicha prueba mostró que no hubo diferencias significativas en la distribución de UCYN-A entre las muestras superficiales de las tres estaciones ($p > 0.05$; Tabla S2), lo que indicaría que la estructura de la comunidad UCYN-A no cambió en la superficie para esas estaciones en ambos cruceros. Posiblemente esto se deba a que el oligotipo 3 del sublinaje UCYN-A2 fue muy dominante y estuvo ampliamente distribuido en todas las estaciones de muestreo. No obstante, el número de muestras también pudo haber influido en el resultado obtenido, quizás se necesita un mayor número de muestras para comprobar si hay diferencias significativas en la distribución de UCYN-A entre las estaciones de muestreo.

Por otro lado, se comparó la distribución de UCYN-A entre los cruceros, usando las muestras de superficie, PMC y fondo de la estación costera y de superficie de las estaciones medias (dado que el número de muestras del resto de las estaciones medias y oceánicas con respecto a la profundidad fue desigual), en la cual tampoco hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los cruceros.

Se realizaron dos pruebas de Mantel, en la primera se analizaron las muestras superficiales de ambos cruceros, mientras que en la segunda prueba únicamente se utilizaron las muestras de la superficie del crucero MAZ IV. Ambas pruebas mostraron que las distancias entre las muestras de la matriz de disimilitud de Bray-Curtis no están correlacionadas significativamente ($p > 0.05$) con la separación geográfica de las estaciones, lo que indica que la distancia geográfica no afecta a la estructura de la comunidad UCYN-A de la superficie. Sin embargo, el resultado obtenido en esta prueba podría deberse a que no hay suficientes muestras, pues las gráficas de ordenación parecen indicar que la comunidad oceánica en el crucero MAZ IV es muy diferente a las comunidades de las estaciones media y costera.

e) Distribución de las ASVs más abundantes de la comunidad UCYN-A

En el mapa de calor se muestra una agrupación por similitud de los 50 ASVs más abundantes representativos de cada oligotipo y de las muestras de ambos cruceros (Figura 15). En el dendograma de las ASVs se observan seis grandes grupos de ASVs y, de estos, sólo algunos ASVs son únicos para cada muestra. Las ASVs 954 y 1096 (ver barra azul de la Figura 15) pertenecientes al oligotipo 1 se encontraron únicamente en la superficie de las estaciones media (IV.M.S) y la más oceánica (IV.O2.S) del crucero MAZ IV, respectivamente. La ASV 4 fue la más abundante y se distribuyó ampliamente en todas las muestras, al igual que la ASV 5, ambas pertenecientes al oligotipo 3 (sublinaje UCYN-A2). Por otro lado, las ASVs no asignadas a ningún sublinaje de UCYN-A (ASVs 168, 174 y 186) presentaron una distribución diferente entre ellas, dado que la ASV 174 sólo estuvo presente en el crucero MAZ IV, mientras que la ASV 186 estuvo presente principalmente en MAZ V, y en la superficie de la estación más oceánica de MAZ IV (IV.O2.S). Por su parte, la ASV 168 parece distribuirse por igual en ambos cruceros. Por otra parte, se observa que la comunidad

de las muestras de la zona mezclada (V.C.ZM) y de fondo de la estación costera (V.C.F) de MAZ V fueron muy similares, a excepción de la ASV 168, que sólo se encontró en la zona mezclada. Además, seis ASVs fueron únicos (y con una alta abundancia relativa) del fondo de la estación costera del MAZ IV (IV.C.F); esta muestra presentó un mayor número de ASVs en comparación con el fondo de esta misma estación en el crucero MAZ V (V.C.F), en la cual no se encontró ningún ASV único. Con respecto a la superficie de las estaciones oceánicas de MAZ IV, la más oceánica (IV.O2.S) presentó un mayor número de ASVs y siete ASVs únicos, mientras que en la superficie de la estación oceánica IV.O1.S sólo se encontraron dos ASVs únicos.

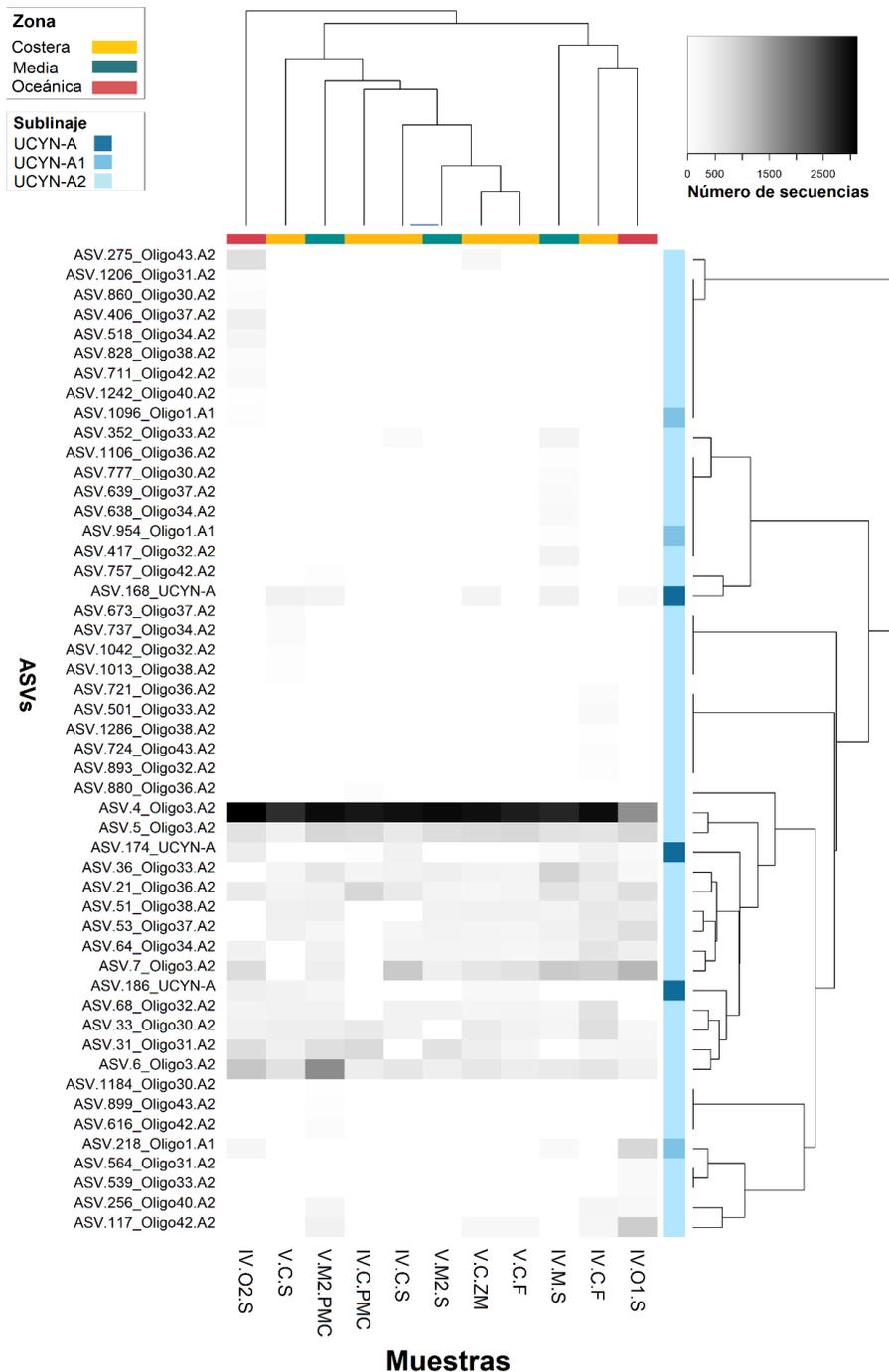


Figura 15. Mapa de calor con la distribución de la abundancia relativa de los 50 ASVs más abundantes representativos de los 13 oligotipos de UCYN-A. La escala de color representa el número de secuencias para cada muestra, siendo el color blanco cero y el negro el valor más abundante. Las filas indican las ASVs y las columnas las 11 muestras. La barra de color horizontal indica las diferentes zonas de muestreo, mientras que la barra vertical azul denota los sublinajes UCYN-A encontrados. Abreviaturas: Etiquetas IV o V= crucero MAZ IV o MAZ V; estaciones: C= costera, M= media, O= oceánica, profundidad: S= superficie, PMC= primer máximo de clorofila, F= fondo, ZM= zona mezclada.

f) ASVs compartidas y únicas entre las muestras superficiales de todas las estaciones del crucero MAZ IV y las profundidades de muestreo de la zona costera para los cruceros MAZ IV y MAZ V

En general, se observó que las ASVs presentes en las muestras superficiales de las estaciones del crucero MAZ IV se distribuyeron ampliamente a lo largo del transecto (Figura S7). La muestra superficial de la estación costera presentó el porcentaje más bajo de ASVs únicas (14 %) en comparación con la muestra superficial de la estación más oceánica, que mostró el porcentaje más alto de ASVs únicas (53.5 %). Por otro lado, entre las cuatro estaciones de las muestras superficiales se compartieron muy pocas ASVs (66), en contraste con las estaciones media y la oceánica 1, las cuales compartieron el mayor número de ASVs (152). También es relevante mencionar que la muestra superficial de la estación costera compartió muy pocas ASVs con las muestras superficiales de las estaciones oceánicas (C, O1 y O2= 71 ASVs), a diferencia de las muestras superficiales de las estaciones media y las oceánicas que compartieron un mayor número de ASVs entre ellas (M, O1 y O2= 99 ASVs).

Con respecto a los diagramas de Venn-Euler que muestran las ASVs únicas y compartidas de las profundidades pertenecientes a la estación costera de cada crucero (Figuras 16 y 17), se observó que la muestra del fondo del crucero MAZ IV tuvo un mayor porcentaje de ASVs únicos (73.6 %), mientras que en el crucero MAZ V la muestra de la superficie presentó un mayor porcentaje de ASVs únicos (55.8 %) con respecto a las muestras de la zona mezclada y de fondo. Por el contrario, la superficie de MAZ IV (19.3 %) y la zona mezclada (V.ZM) (32.8 %) en MAZ V presentaron el porcentaje más bajo de ASVs únicos.

En general, las tres profundidades de muestreo en el crucero MAZ V compartieron más ASVs en comparación con MAZ IV, donde el contraste vertical fue mayor. Por otro lado, las muestras que compartieron más ASVs fueron la superficie y el fondo (67 ASVs) en MAZ IV, así como la zona mezclada (V.ZM) y el fondo (60 ASVs) en MAZ V. En contraste con la superficie y el PMC-ZM que compartieron menos ASVs en ambos cruceros (8 y 4 ASVs en los cruceros MAZ IV y MAZ V, respectivamente).

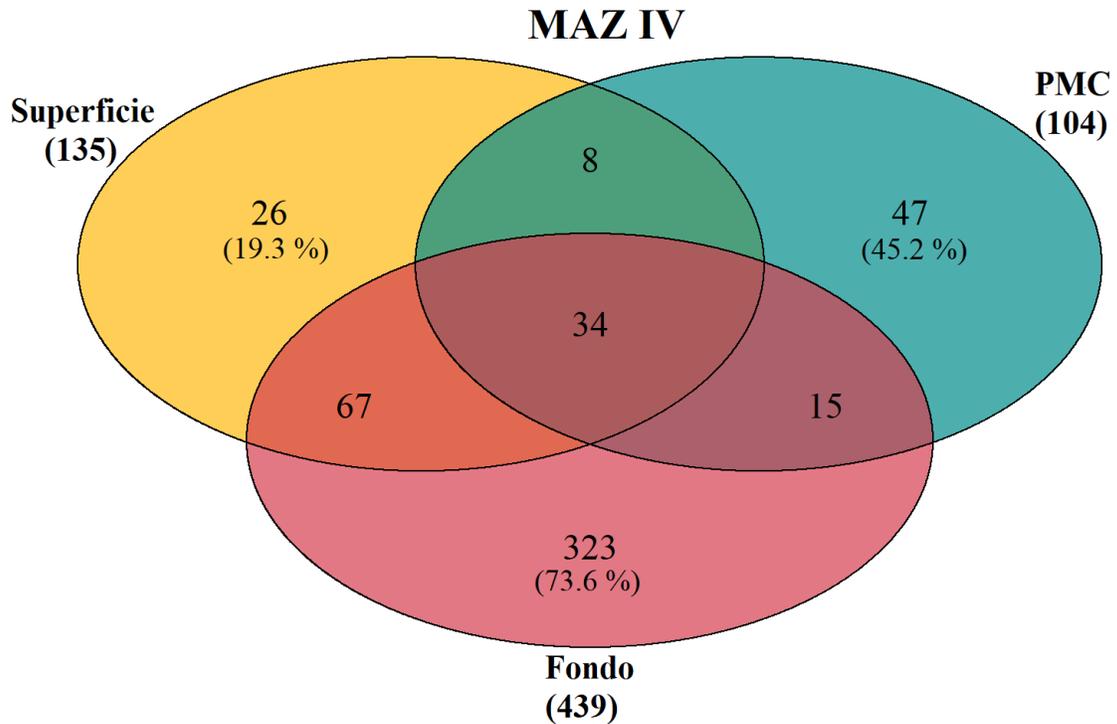


Figura 16. Diagrama de Venn-Euler de las ASVs compartidos entre las profundidades de muestreo de la estación costera del crucero MAZ IV.

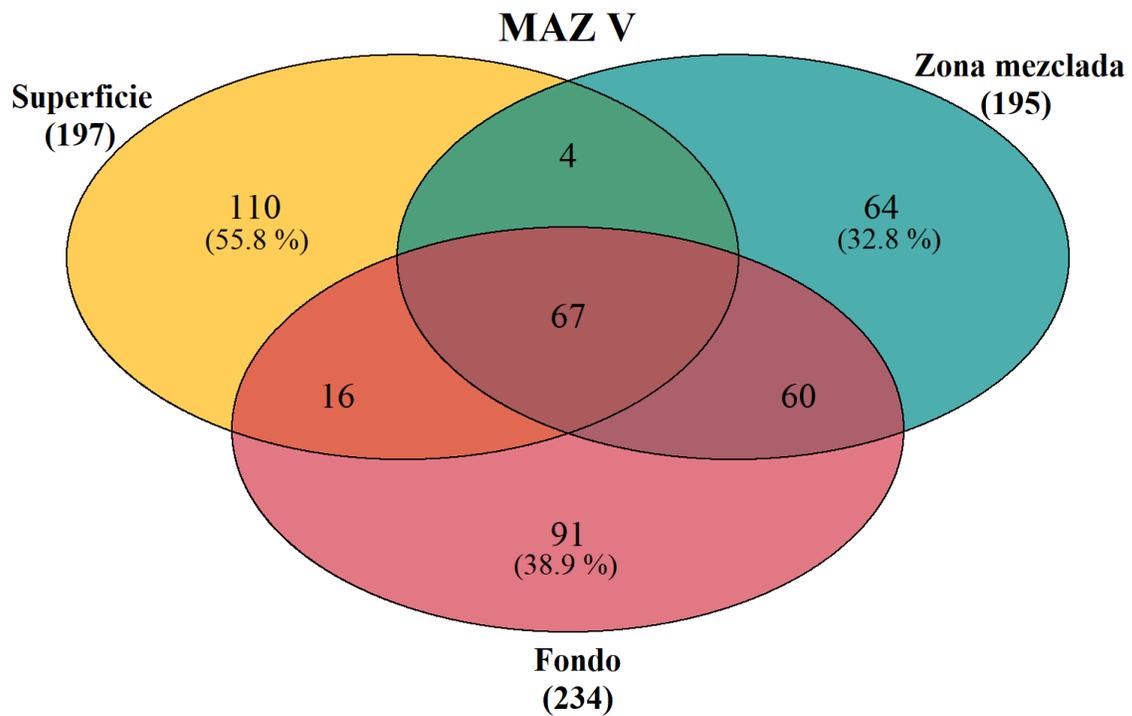


Figura 17. Diagrama de Venn-Euler de las ASVs compartidos entre las profundidades de muestreo de la estación costera del crucero MAZ V.

9. DISCUSIÓN

9.1 Condiciones oceanográficas de la ZMO frente al Puerto de Mazatlán

En la región de estudio ubicada en el ETNP se observaron variaciones oceanográficas en la TSM en ambos cruceros debido a la presencia de un evento débil de La Niña en el año 2018 (crucero MAZ IV) y un evento débil de El Niño en el año 2019 (crucero MAZ V).

Dicha variación de la TSM generó que un mayor volumen de agua superficial presentara temperaturas altas, así como un cambio en el desplazamiento horizontal de la GCW durante el crucero MAZ V.

El ETNP se considera una zona de transición tropical-subtropical significativamente influenciada por procesos advectivos a gran escala, que se ven afectados principalmente por las masas agua de la corriente de California (CCW) y SsStW (Godínez *et al.*, 2010; Kurczyn *et al.*, 2012). En el diagrama T-S del crucero MAZ V se observa que la masa TrW proviene de la mezcla del TSW (que no estuvo presente en esta zona de estudio pero tuvo influencia en las costas del crucero MAZ V) y el GCW, que se caracteriza por tener alta salinidad ($> 35.1 \text{ g kg}^{-1}$), baja concentración de nutrientes y, por lo general, valores relativamente altos de O_2 disuelto (Brusca y Medellín, 2010; Portela *et al.*, 2016).

En general, en esta zona de estudio la concentración de O_2 en la superficie del mar fue alta ($> 200 \mu\text{M}$); sin embargo, la concentración de O_2 fue de $191 \mu\text{M}$ en la estación costera del MAZ IV debido a la entrada de la masa StSsW pobre en O_2 , tal como reporta Pajares *et al.* (2020) en dos estaciones costeras en un estudio realizado en la ZMO localizada en el ETNP, en las que la concentración de O_2 fue de 100 a $178 \mu\text{M}$.

Por otro lado, las aguas medias y profundas del ETNP se caracterizan por tener bajas concentraciones de O_2 (Fiedler y Talley, 2006). En un análisis de datos del Pacífico Tropical Oriental, se reportó que el agotamiento de O_2 se acentúa en áreas donde hay una capa fotosintética altamente productiva y una fuerte termoclina que impide la advección y el intercambio de agua más rica en O_2 desde arriba (Cepeda-Morales *et al.*, 2013), lo cual concuerda con el inicio de la ZMO en el presente estudio ($< 20 \mu\text{M}$ de acuerdo con Paulmier y Ruiz-Pino (2009)), que se encontró en la zona eufótica en la estación costera de MAZ IV y por debajo de la zona eufótica en las estaciones medias y oceánicas en ambos cruceros.

En el crucero MAZ IV, el inicio de la ZMO se localizó a partir de los 17 m de profundidad en la estación costera IV.C, a 48 m de profundidad en la estación media (IV.M) y a 68 m de profundidad en las estaciones oceánicas (IV.O1 y IV.O2); mientras que en el crucero MAZ V, la ZMO estuvo ausente en las estaciones costera V.C y media V.M1. Por otro lado, en las estaciones media V.M2 y la más oceánica V.O2 el inicio de la ZMO se encontró a 70 y 98 m de profundidad, respectivamente. Por lo tanto, se observa una diferencia de 30 m de profundidad con respecto al inicio de la ZMO entre ambos cruceros en las estaciones oceánicas.

El inicio de las ZMO se encuentran normalmente por debajo de la zona eufótica; sin embargo, en el Pacífico Tropical Oriental, las ZMO a menudo coinciden con la zona eufótica (Gray *et al.*, 2002; Paulmier y Ruiz-Pino, 2009; Hofmann *et al.*, 2011), tal y como se observó en la estación EC de MAZ IV. De la misma manera, se ha reportado la presencia de aguas subóxicas ($< 10 \mu\text{M O}_2$) a profundidades inferiores a 150 m en el Pacífico Tropical Oriental (Helly y Levin, 2004; Kirkpatrick *et al.*, 2006) y el límite superior de la ZMO en el ETNP entre 60 y 100 m de profundidad (Maske *et al.*, 2010; Pajares *et al.*, 2020), lo que concuerda con los resultados encontrados en las estaciones oceánicas de este estudio. Por otra parte, los valores máximos de clorofila *a* en la estación más oceánica del crucero MAZ IV (2 mg/m^3) a 30 m de profundidad fueron mayores en comparación con la estación más oceánica de MAZ V (1.5 mg/m^3) a 38 m de profundidad, debido posiblemente a las condiciones hidrográficas dadas por el fenómeno de El Niño, lo cual se ha reportado en otras regiones del sur del Golfo de California, en donde se ha identificado una disminución de la clorofila *a* ante eventos de calentamiento como El Niño (Álvarez-Borrego, 2012).

Con respecto a las concentraciones de nutrientes, se ha reportado un patrón relativamente constante en las secciones verticales del ETNP en frente de México, en donde el NO_3^- y PO_4^{3-} aumentan con la profundidad (Pajares *et al.*, 2019). Esto concuerda con esta zona de estudio, pues en ambos cruceros las mayores concentraciones de estos nutrientes se encontraron por debajo de los 400 m de profundidad en las estaciones oceánicas. Sin embargo, en ambos cruceros, con excepción de la estación costera de MAZ V, las concentraciones de NO_3^- y PO_4^{3-} fueron relativamente heterogéneas debido a la estratificación de la columna de agua. Además, los valores de la concentración de estos nutrientes fueron mayores en el crucero MAZ IV. A su vez ocasionando mayor concentración de clorofila *a* debido a una menor

proporción de la masa GCW y a las condiciones hidrográficas comparado con MAZ V. Por otro lado, se encontró un máximo de NO_2^- a 250 m de profundidad en las estaciones oceánicas de ambos cruceros, con valores más altos en MAZ IV (1.49 μM en EO1 y 1.96 μM en EO2), en comparación con MAZ V (0.10 μM), lo que concuerda con el máximo de NO_2^- encontrado en el núcleo de la ZMO en otros estudios realizados en el ETNP (Cepeda-Morales *et al.*, 2013; Pajares *et al.*, 2019).

9.2 Composición y diversidad espacio-temporal del clado UCYN-A

En general, el clado UCYN-A se encontró principalmente en las muestras superficiales de todas las estaciones, así como en el PMC y en el fondo de la estación costera en ambos cruceros, mientras que en el crucero MAZ V también se encontró a este clado de cianobacterias en la muestra del PMC de la estación media.

Tal como se esperaba, los genes *nifH* presentes en UCYN-A no se detectaron en las muestras que correspondieron a la ZMO, a excepción de la muestra de fondo de la estación costera del crucero MAZ IV, en donde se detectaron 12 oligotipos pertenecientes al sublinaje UCYN-A2 de los 13 oligotipos encontrados en este estudio.

La mayoría de las secuencias encontradas estuvieron filogenéticamente relacionadas con el sublinaje UCYN-A2 (12 de 12 oligotipos presentes en la base de datos de Turk-Kubo *et al.* (2017); representando el 99.91 % de las secuencias de UCYN-A y, en menor medida, con el sublinaje UCYN-A1 (1 de 20 oligotipos; 0.09% de las secuencias de UCYN-A), lo que concuerda con lo reportado en otros estudios. Por ejemplo, UCYN-A2 también se encontró en la mayoría de las secuencias obtenidas en una región de surgencia en el Noroeste de España, en el Océano Atlántico Norte, en donde se reportó que UCYN-A2 fue tres veces más abundante que UCYN-A1 (Moreira-Coello *et al.*, 2017; 2019). En el Atlántico Norte Tropical la abundancia de UCYN-A2 fue alta tanto en aguas tropicales y subtropicales, como en aguas templadas (Martínez-Pérez *et al.*, 2016).

La composición de la comunidad UCYN-A en este transecto que va de la costa al océano abierto en el ETNP estuvo dominada por el oligotipo 3 del sublinaje UCYN-A2 (96.2 % de las secuencias UCYN-A), que parece no tener biogeografía definida, lo que concuerda con lo reportado en otros estudios. Por ejemplo, en una investigación realizada en aguas costeras

en el Estrecho de Dinamarca y en el sistema de la Corriente de California, se reportó al oligotipo 3 como el tercer oligotipo más abundante y con una amplia distribución (Turk-Kubo *et al.*, 2017). Del mismo modo, el oligotipo 3 representó más del 90% del conjunto de secuencias relacionadas a UCYN-A2 en la bahía de Monterey, California (Cabello *et al.*, 2020), así como en una región de surgencia en el Noroeste de España (Moreira-Coello *et al.*, 2019) y en la Laguna de Coral de Nueva Caledonia (Henke *et al.*, 2018).

En contraste con otras investigaciones en las que se ha encontrado una elevada diversidad genética de UCYN-A en distintos ecosistemas marinos, en los que en su mayoría se ha encontrado a los cuatro sublinajes UCYN-A (Thompson *et al.*, 2014; Farnelid *et al.*, 2016; Turk-Kubo *et al.*, 2017, 2021; Cornejo-Castillo *et al.*, 2019; Cabello *et al.*, 2020), la diversidad genética encontrada en esta zona de estudio fue relativamente baja, se encontraron sólo dos de los cuatro sublinajes caracterizados de UCYN-A. Además, la diversidad de este grupo de diazótrofos fue diferente en ambos cruceros, posiblemente debido a que en los dos años de muestreo hubo condiciones climáticas y oceanográficas muy distintas.

En general, la mayor diversidad se encontró en el crucero MAZ IV, principalmente en el fondo hipóxico de la estación costera, en donde la columna de agua estuvo bien estratificada. Cabe señalar, que de entre las 11 muestras, esta fue la que tuvo la mayor concentración en la mayoría de los nutrientes (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , NID), y se encontró a 17 °C de temperatura, lo que posiblemente favoreció la presencia del sublinaje UCYN-A2 en esta muestra, pues este sublinaje tiene preferencia por aguas relativamente frías (10-20 °C) y ricas en N (Thompson *et al.*, 2014; Cabello *et al.*, 2020; Turk-Kubo *et al.*, 2021).

Por otra parte, la menor diversidad se encontró en la muestra del PMC en la estación costera del MAZ IV. Es importante mencionar que no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre esta muestra y los factores ambientales. No hay alguna explicación clara del porqué esta muestra obtuvo la menor diversidad. Sin embargo, de entre las muestras que amplificaron al gen *nifH*, en esta muestra del PMC se encontró la mayor concentración de PO_4^{3-} (3.42 μM). Stenegren *et al.* (2018) en un estudio a nivel mundial mostró una correlación negativa entre la presencia de UCYN-A y la concentración de P inorgánico disuelto. De modo que, probablemente UCYN-A2 respondió negativamente a este factor.

En investigaciones recientes se ha evidenciado que el sublinaje UCYN-A2 no sólo se distribuye en aguas costeras ricas en nutrientes, sino también en zonas oceánicas oligotróficas

y en aguas templadas de alta latitud (Cabello *et al.*, 2016; Martínez-Pérez *et al.*, 2016). De forma semejante, en esta zona de estudio, el sublinaje UCYN-A2 estuvo presente en todas las estaciones de ambos cruceros.

Por el contrario, el sublinaje UCYN-A1 únicamente se encontró en las muestras superficiales de las estaciones medias y oceánicas del crucero MAZ IV, lo que concuerda con otras investigaciones, en las que ha encontrado a este sublinaje principalmente en regiones oligotróficas del océano abierto en el Pacífico Subtropical y en el Atlántico (Thompson *et al.*, 2014; Moreira-Coello *et al.*, 2019). Lo anterior indica que hubo variabilidad temporal en la composición de la comunidad UCYN-A entre ambos cruceros, dado que el sublinaje UCYN-A1 solo estuvo presente en el crucero MAZ IV.

Los datos actuales sugieren que a pesar de que los diferentes sublinajes UCYN-A y sus huéspedes probablemente tienen distintas necesidades fisiológicas (por ejemplo, requerimientos de nutrientes), pueden coexistir en el mismo entorno, lo que indica que estos sublinajes, en algunas circunstancias, comparten un nicho similar (Thompson *et al.*, 2014; Turk-Kubo *et al.*, 2017; Moreira-Coello *et al.*, 2019). De hecho, Shiozaki *et al.* (2017) resaltó que UCYN-A2 tiene una notable capacidad para proliferar en diversas regiones marinas. En el presente estudio se reporta una gran abundancia de secuencias de UCYN-A2 en las estaciones costera y oceánicas, lo que implica que este sublinaje puede representar un papel muy importante en la FBN en esta región del ETNP. Además, se encontró la presencia de UCYN-A1 y UCYN-A2 en la superficie de las dos estaciones oceánicas y la estación media del crucero MAZ IV, lo que indica una probable co-ocurrencia de ambos sublinajes en el océano abierto de esta región. Previamente, se ha observado que los sublinajes UCYN-A1 y UCYN-A2 coexisten en regiones costeras, como en la cuenca de Santa Mónica (Hamersley *et al.*, 2011), la plataforma costera del Atlántico Medio norteamericano (Mulholland *et al.*, 2012) y en la bahía de Monterey, California (Cabello *et al.*, 2020). Asimismo, se ha informado de la co-ocurrencia de ciertos oligotipos de UCYN-A1 (oligotipo 1) y UCYN-A2 (oligotipo 3 y oligotipo 43) en la Laguna de Noumea en Nueva Caledonia (Turk-Kubo *et al.*, 2015, 2017), y se ha sugerido que estos diazótrofos pueden ser transportados grandes distancias por las corrientes oceánicas mientras permanecen activos (Shiozaki *et al.*, 2013). A pesar de ello, aún no está claro si estos lugares representan nichos superpuestos para los sublinajes UCYN-A1 y UCYN-A2 o si la diversidad de UCYN-A observada en estas

regiones es el resultado de la mezcla de aguas oligotróficas y costeras. Por otro lado, la diferente distribución global de estos sublinajes puede deberse a la adaptación de sus respectivos hospederos a ambientes específicos y a las diferentes etapas de su ciclo de vida (Hagino *et al.*, 2013).

Por otra parte, en el crucero MAZ IV se encontró un bajo porcentaje (14 %) de ASVs únicos en la muestra superficial de la estación costera, mientras que en las muestras superficiales de las estaciones media y la más oceánica se obtuvo un mayor porcentaje (> 50 %) de ASVs únicos, probablemente debido a la presencia de secuencias de ASVs pertenecientes al sublinaje UCYN-A1 que sólo estuvieron presentes en dichas estaciones y ausentes en la muestra superficial de la estación costera. Sin embargo, en general la estructura de la comunidad UCYN-A fue muy similar entre las estaciones de muestreo dado que la mayoría de las ASVs correspondieron al sublinaje UCYN-A2. Particularmente, los oligotipos 3, oligotipo 34 y oligotipo 36 (UCYN-A2) se distribuyeron ampliamente a lo largo del transecto, tanto en la muestra superficial de la estación costera como en las muestras superficiales de las estaciones media y oceánicas oligotróficas de ambos cruceros.

Finalmente, en artículos previos se ha informado del hallazgo de nuevos oligotipos, en la región de surgencia del noroeste de España en el Atlántico Norte (Moreira-Coello *et al.*, 2019), en la Laguna de Coral de Nueva Caledonia (Henke *et al.*, 2018) y en el sistema de corrientes del sur de California, en donde se revelaron 34 oligotipos nuevos, aunque estos representaron menos del 1% de las secuencias UCYN-A (Turk-Kubo *et al.*, 2021). En el presente estudio un alto porcentaje de secuencias *nifH* (44.9 % del total de las secuencias) sólo se asignaron hasta Bacteria, por lo cual se especula que entre ese porcentaje de secuencias pueden existir secuencias que corresponden al clado UCYN-A y que aún no han sido clasificadas pues no se ha realizado ningún estudio previo en ZMO. De igual forma, el 0.54 % del total de las secuencias correspondieron al clado UCYN-A, pero no se asignaron a ningún sublinaje. Posiblemente, según el árbol filogenético y el dendograma de los ASVs en el mapa de calor, estas secuencias de ASVs sin asignar están emparentadas con el sublinaje UCYN-A2, por lo que podrían ser nuevos oligotipos de este sublinaje o incluso corresponder a algún sublinaje UCYN-A diferente.

9.3 Factores oceanográficos que controlan la distribución de UCYN-A en el Pacífico central mexicano

En la zona de estudio se presentaron procesos de surgencia y eventos ENSO (el fenómeno de La Niña en 2018 (MAZ IV) y de El Niño en 2019), lo que tuvo una gran influencia en las características hidrográficas y bioquímicas que se encontraron en cada crucero y que presumiblemente indujeron las diferencias temporales en la estructura de la comunidad observadas en el fondo de la estación costera entre ambos cruces. Estos eventos probablemente también ocasionaron diferencias en la composición de la comunidad UCYN-A a lo largo del transecto, pues no se encontró al sublinaje UCYN-A1 en ninguna muestra de MAZ V y la diversidad fue mayor en el crucero MAZ IV.

El intervalo de temperatura en el que se detectó a UCYN-A2 en el presente trabajo (17.3-24.4 °C) concuerda con las temperaturas reportadas en otros estudios, en los cuales se ha indicado que este sublinaje se encuentra preferentemente en aguas relativamente frías (10 a 20 °C) y ricas en N (Thompson *et al.*, 2014; Cabello *et al.*, 2020; Turk-Kubo *et al.*, 2021), aunque también se ha encontrado en aguas más cálidas ($\geq 26^\circ\text{C}$) en la Laguna de Coral de Nueva Caledonia (Henke *et al.*, 2018).

En un estudio realizado por Henke *et al.* (2018) sobre la diversidad a nivel de resolución de oligotipos de UCYN-A se explica que, a pesar de que los oligotipos dentro de los sublinajes tienden a encontrarse juntos, hay algunas excepciones notables con respecto a los rangos de temperatura en los que se encuentran, reportando que el oligotipo 3 y el oligotipo 43 del sublinaje UCYN-A2 difieren con respecto a la temperatura superficial del mar en la que se han encontrado. Mientras que el oligotipo 3 no mostró ninguna relación con la temperatura, el oligotipo 43 se correlacionó positivamente con temperaturas $\geq 26^\circ\text{C}$ (Henke *et al.*, 2018). En el presente estudio ambos oligotipos se encontraron entre 17 y 24 °C, por lo que su presencia no se asoció a ningún valor específico de temperatura. Sin embargo, para estudios posteriores, se sugiere tomar en cuenta que la variación de las secuencias a escala fina podría ser importante para la comprensión de la distribución global de las poblaciones de UCYN-A, ya que las condiciones ambientales parecen influir en la distribución de los oligotipos dentro del mismo sublinaje.

Por otro lado, se ha encontrado al sublinaje UCYN-A1 en co-ocurrencia con UCYN-A3 en un ambiente cálido ($> 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) en aguas tropicales y subtropicales de los giros oligotróficos del océano Pacífico (Turk-Kubo *et al.*, 2017). Igualmente, se informó de la correlación positiva del oligotipo 1 (UCYN-A1) a temperaturas de 20 a 23 $^{\circ}\text{C}$ (Henke *et al.*, 2018). En este estudio, se encontró al oligotipo 1 (sublinaje UCYN-A1) en el crucero MAZ IV a una temperatura de 22 a 24 $^{\circ}\text{C}$ en las muestras superficiales de las estaciones medias y oceánicas. El intervalo de concentración de O_2 (210 a 226 μM) en el que se encontró a UCYN-A1 también favoreció su presencia en la zona eufótica de las estaciones media y oceánicas, puesto que se ha visto que UCYN-A1 prefiere aguas bien oxigenadas, una característica de la masa de GCW en la que se halló a este grupo de cianobacterias. Por su parte, UCYN-A2 mostró una distribución más amplia, ya que se halló en todas las estaciones de ambos cruceros, tolerando altas y bajas concentraciones de O_2 (hasta 16.6 μM en el fondo de la estación costera de MAZ IV).

Entre las consecuencias de la anomalía de temperatura fría presente en el crucero MAZ IV, se incluyen las altas concentraciones de nutrientes en las estaciones costera y media en comparación con las mismas estaciones de MAZ V. Es preciso señalar que, en particular, las muestras superficiales de las estaciones oceánicas de MAZ IV, en donde se halló al sublinaje UCYN-A1, tuvieron los valores más bajos de NID y de NH_4^+ , en comparación con el resto de las muestras de ambos cruceros, lo que corrobora que este grupo de cianobacterias se distribuye preferentemente en ambientes marinos oligotróficos cálidos. De hecho, el oligotipo 1 (UCYN-A1) tuvo la mayor abundancia en las muestras superficiales de las estaciones oceánicas más oligotróficas.

En contraste, UCYN-A2 y las secuencias correspondientes al linaje UCYN-A no asignadas a algún sublinaje se encontraron en todos los rangos de concentración de nutrientes de todas las estaciones.

UCYN-A2 se detectó tanto en la estación costera, con una disponibilidad relativamente alta de NID (concentraciones de 0.4 a 14.7 μM), como en las estaciones oceánicas superficiales oligotróficas (concentraciones de 0.3 a 0.5 μM), tal y como se reporta en diversos artículos (Turk-Kubo *et al.*, 2018, 2021), los cuales dan a conocer que la presencia de UCYN-A no se excluye, ni la actividad de FBN se inhibe, ante las concentraciones elevadas de NID (Dixon *et al.*, 2004; Turk-Kubo *et al.*, 2018; Mills *et al.*, 2020). Aunque en nuestro estudio no se

midieron tasas de FBN, sí se demuestra la capacidad de UCYN-A2 de distribuirse en zonas con relativos altos valores de NID.

Se sabe que UCYN-A1 carece de la capacidad genética para asimilar directamente NO_3^- (Tripp *et al.*, 2010), por lo que se sugiere que cuando el NO_3^- está disponible para el huésped en la columna de agua, UCYN-A obtiene N de su anfitrión para su crecimiento, además de continuar con el proceso activo de FBN (Turk-Kubo *et al.*, 2018). Dos estudios realizados en el Atlántico Subtropical Norte incluyeron la adición de N como tratamiento en un experimento e informaron de un aumento en la abundancia de UCYN-A en aproximadamente un orden de magnitud, tras la adición de nitrato de amonio, lo que indica que la simbiosis UCYN-A/haptófito es capaz de crecer en altas concentraciones de N. De la misma manera, se ha reportado que la FBN no se inhibe ante la adición de nitrato de amonio a las poblaciones de UCYN-A (Langlois *et al.*, 2012; Krupke *et al.*, 2015). Por otra parte, también se detectó la presencia de UCYN-A1 y UCYN-A2 en rangos de NO_3^- de concentración < 0.02 a $1.38 \mu\text{M}$ en latitudes subtropicales y tropicales de los océanos Atlántico, Índico y Pacífico (Cabello *et al.*, 2016). Sin embargo, en el presente estudio se encontró al sublinaje UCYN-A1 en las estaciones media y oceánicas superficiales del MAZ IV en concentraciones de NO_3^- de 0.2 a $5.6 \mu\text{M}$ y al sublinaje UCYN-A2 en las estaciones costera y medias con concentraciones más altas de NO_3^- (0.04 a $8.5 \mu\text{M}$) en ambos cruceros.

En general, los factores que controlan los patrones de distribución de los diferentes sublinajes aún no se comprenden bien; no obstante, estos datos proporcionan información que más adelante podría dilucidar diferencias fisiológicas importantes relacionadas con las diferencias de hábitat, lo cual es esencial para comprender la ecología de este clado de cianobacterias y conocer el papel que tienen en los sistemas oceánicos y costeros.

9.4 Presencia de UCYN-A en la ZMO del Pacífico mexicano

Estudios anteriores han reportado la presencia de diversas y activas comunidades de diazótrofos heterótrofos en aguas hipóxicas del ETSP (Fernandez *et al.*, 2011), en la Ensenada del Sur de California (Hamersley *et al.*, 2011), en la ZMO del Mar de Arabia (Jayakumar *et al.*, 2012) y en aguas subóxicas y anóxicas del Mar Báltico (Farnelid *et al.*, 2013), así como del clado UCYN-B en la ZMO frente a Perú (Loescher *et al.*, 2014).

En el presente estudio se demuestra por primera vez la presencia del sublinaje UCYN-A2 en una ZMO, la cual se encontró en la muestra de fondo hipóxica, con una concentración de 16.6 μM de O_2 , en la estación costera del crucero MAZ IV. Contrario a lo esperado, esta muestra de fondo fue la más diversa de todas las muestras, detectando 12 de 12 oligotipos del sublinaje UCYN-A2 de acuerdo con la base de datos de referencia de Turk-Kubo *et al.*, 2017; mientras que el sublinaje UCYN-A1 estuvo ausente, demostrándose la amplia distribución de UCYN-A2 y su alta capacidad de tolerar diversas condiciones ambientales. Informes previos han propuesto a los sistemas de surgencia costeros y las ZMO como regiones oceánicas potenciales para la FBN por bacterias heterótrofas (Riemann *et al.*, 2010; Fernandez *et al.*, 2011; Hamersley *et al.*, 2011). Dado que el O_2 inactiva el sistema enzimático de la nitrogenasa, usualmente las cianobacterias autótrofas utilizan estrategias de segregación temporal y/o espacial para evitar la desactivación por O_2 durante la FBN (Berman-Frank *et al.*, 2003; Zehr y Kudela, 2011), mientras que los diazótrofos heterótrofos prosperan en las ZMO y otros hábitats pobres en O_2 debido a que requieren condiciones subóxicas para fijar N_2 . Por su parte, UCYN-A fija N_2 durante el día, gracias a que carece de la capacidad de utilizar el fotosistema II que genera O_2 (Zehr *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2014). Esta cianobacteria parece invertir energía en el proceso de FBN en sitios con altas concentraciones de N, lo que favorecería su presencia en ZMO menos profundas con presencia de N (Farnelid *et al.*, 2013; Mills *et al.*, 2020). Sin embargo, la simbiosis UCYN-A/haptofito, no podría encontrarse en las ZMO que se corresponden con la zona afótica del océano abierto, debido a que el huésped de esta cianobacteria necesita luz para llevar a cabo la fotosíntesis.

Se ha demostrado que las regiones de surgencia costeras ricas en nutrientes en los océanos tropicales y subtropicales desempeñan un papel fundamental en el ciclo de nutrientes y en la FBN (Zhang *et al.*, 2015). La estación costera en donde se halló a este clado de cianobacterias estuvo sujeta a cambios ambientales y oceanográficos con la presencia del fenómeno de La Niña durante el crucero MAZ IV, que influyó en la intensidad de la surgencia generando aguas más frías y una mayor concentración de nutrientes (Behrenfeld *et al.*, 2001) respecto al crucero MAZ V. A pesar de ello, se plantea que los cambios temporales de las condiciones hidrográficas no afectaron al sublinaje UCYN-A2. No obstante, no se sabe si este sublinaje puede realizar la FBN activamente en aguas hipóxicas y, por tanto, hacen falta más datos

moleculares (ej.: expresión del gen *nifH* de UCYN-A), así como la medición de tasas de FBN en estos sistemas marinos con bajas concentraciones de O₂.

10. CONCLUSIONES

1. Mediante la secuenciación masiva del gen *nifH*, este estudio demuestra la presencia de UCYN-A en un transecto frente al Puerto de Mazatlán en dos campañas oceanográficas con distintas condiciones climáticas e hidrográficas en el ETNP.
2. Se determinó la presencia de dos sublinajes UCYN-A1 y UCYN-A2, así como la dominancia del oligotipo 3 del sublinaje UCYN-A2 en todas las muestras.
3. Se encontró una amplia distribución y una composición muy similar del sublinaje UCYN-A2 presente desde la estación costera rica en nutrientes hasta las estaciones oceánicas oligotróficas de ambos cruceros, mientras que el sublinaje UCYN-A1 sólo se encontró en las estaciones media y oceánicas del crucero MAZ IV, corroborando la preferencia de este sublinaje por las zonas de mar abierto. Además, este estudio da a conocer la co-ocurrencia de los sublinajes UCYN-A1 y UCYN-A2 en aguas oceánicas superficiales.
4. Contrario a lo esperado, la mayor diversidad del clado UCYN-A se encontró en el fondo hipóxico de la estación costera, correspondiente a la ZMO en el crucero MAZ IV, lo que se atribuye principalmente a la presencia de eventos de surgencia y el fenómeno ENSO, que tuvieron gran influencia en la distribución del clado UCYN-A y en las características hidrográficas y bioquímicas que se encontraron en cada crucero.
5. En general, la diversidad de la comunidad UCYN-A también fue distinta en ambos cruceros, encontrándose una mayor diversidad en el crucero MAZ IV.
6. UCYN-A se encontró principalmente en la zona eufótica bien oxigenada a lo largo del transecto en ambos cruceros, pero también en el fondo hipóxico de la estación costera, en donde se detectó la presencia del sublinaje UCYN-A2.
7. Esta investigación nos permite tener una comprensión inicial del papel que juega UCYN-A en las ZMO, favoreciendo las próximas investigaciones acerca de este clado de cianobacterias sujetas a las distintas condiciones presentes en las ZMO.

8. En el futuro se necesitarán estudios más enfocados en los factores ambientales y nutrimentales que afectan el crecimiento, la distribución y la actividad de los sublinajes UCYN-A, así como en la medición de tasas de FBN en estos sistemas marinos con bajas concentraciones de O₂.

11. LITERATURA CITADA

- Ahmed, A., Gauns, M., Kurian, S., Bardhan, P., Pratihary, A., Naik, H., *et al.* (2017). Nitrogen fixation rates in the Eastern Arabian Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 191, 74–83. doi:10.1016/j.ecss.2017.04.005.
- Álvarez-Borrego, S. (2012). Phytoplankton biomass and production in the Gulf of California: A review. *Bot. Mar.* 55, 119–128. doi:10.1515/BOT.2011.105.
- Angel, R., Nepel, M., Panhölzl, C., Schmidt, H., Herbold, C. W., Eichorst, S. A., *et al.* (2018). Evaluation of primers targeting the diazotroph functional gene and development of NifMAP - A bioinformatics pipeline for analyzing *nifH* amplicon data. *Front. Microbiol.* 9:703. doi:10.3389/fmicb.2018.00703.
- Azimuddin, K. M., Hirai, J., Suzuki, S., Haider, M. N., Tachibana, A., Watanabe, K., *et al.* (2016). Possible association of diazotrophs with marine zooplankton in the Pacific Ocean. *Microbiologyopen.* 5, 1016–1026. doi:10.1002/mbo3.385.
- Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., McClain, C. R., Feldman, G. C., Los, S. O., Tucker, C. J. *et al.* (2001). Biospheric primary production during an ENSO transition. *Science.* 291, 2594–2597. doi:10.1126/ciencia.1055071.
- Benavides, M., and Voss, M. (2015). Five decades of N₂ fixation research in the North Atlantic Ocean. *Front. Mar. Sci.* 2:40. doi:10.3389/fmars.2015.00040.
- Bentzon-tilia, M., Traving, S. J., Mantikci, M., Knudsen-leerbeck, H., Hansen, J. L. S., Markager, S., *et al.* (2015). Significant N₂ fixation by heterotrophs, photoheterotrophs and heterocystous cyanobacteria in two temperate estuaries. *ISME J.* 9, 273–285. doi:10.1038/ismej.2014.119.
- Bergman, B., Sandh, G., Lin, S., Larsson, J., and Carpenter, E. J. (2013). *Trichodesmium* - a widespread marine cyanobacterium with unusual nitrogen fixation properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 286–302. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00352.x.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., and Falkowski, P. (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res. Microbiol.* 154, 157–164. doi:10.1016/S0923-2508(03)00029-9.
- Biegala, I. C., and Raimbault, P. (2008). High abundance of diazotrophic picocyanobacteria (<3 μm) in a Southwest Pacific coral lagoon. *Aquat. Microb. Ecol.* 51, 45–53. doi:10.3354/ame01185.
- Bird, C., Martinez, J. M., O'Donnell, A. G., and Wyman, M. (2005). Spatial distribution and transcriptional activity of an uncultured clade of planktonic diazotrophic γ-proteobacteria in the Arabian Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2079–2085. doi:10.1128/AEM.71.4.2079-2085.2005.
- Blais, M., Tremblay, J. É., Jungblut, A. D., Gagnon, J., Martin, J., Thaler, M., *et al.* (2012). Nitrogen fixation and identification of potential diazotrophs in the Canadian Arctic. *Global Biogeochem. Cycles.* 26:GB3022. doi:10.1029/2011GB004096.
- Bolker, B., Huber, W., Lumley, T., Maechler, M., Magnusson, A., and Moeller, S. (2020). Package ‘gplots’ v3.1.1: Various R programming tools for plotting data description. <https://github.com/talgalili/gplots>.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., *et al.* (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857. doi:10.1038/s41587-019-0209-9.
- Bombar, D., Heller, P., Sanchez-Baracaldo, P., Carter, B. J., and Zehr, J. P. (2014). Comparative genomics reveals surprising divergence of two closely related strains of uncultivated UCYN-A cyanobacteria. *ISME J.* 8, 2530–2542. doi:10.1038/ismej.2014.167.
- Bombar, D., Paerl, R. W., and Riemann, L. (2016). Marine non-cyanobacterial diazotrophs: Moving beyond molecular detection. *Trends Microbiol.* 24, 916–927. doi:10.1016/j.tim.2016.07.002.
- Bombar, D., Turk-Kubo, K. A., Robidart, J., Carter, B. J., and Zehr, J. P. (2013). Non-cyanobacterial *nifH* phylotypes in the North Pacific Subtropical Gyre detected by flow-cytometry cell sorting. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 705–715. doi:10.1111/1758-2229.12070.
- Bonnet, S., Biegala, I. C., Dutrieux, P., Slemmons, L. O., and Capone, D. G. (2009). Nitrogen fixation in the Western Equatorial Pacific: Rates, diazotrophic cyanobacterial size class distribution, and biogeochemical significance. *Global Biogeochem. Cycles.* 23: GB3012. doi:10.1029/2008GB003439.
- Bonnet, S., Dekaezemacker, J., Turk-Kubo, K. A., Moutin, T., Hamersley, R. M., Grosso, O., *et al.* (2013). Aphotic N₂ fixation in the Eastern Tropical South Pacific Ocean. *PLoS One.* 8: e81265. doi:10.1371/journal.pone.0081265.
- Bopp, L., Le Quééré, C., Heimann, M., Manning, A. C., and Monfray, P. (2002). Climate-induced oceanic oxygen fluxes: Implications for the contemporary carbon budget. *Global Biogeochem. Cycles.* 16, 6–13. doi:10.1029/2001gb001445.

- Brandes, J. A., Devol, A. H., and Deutsch, C. (2007). New developments in the marine nitrogen cycle. *Chem. Rev.* 107, 577–589. doi:10.1021/cr050377t.
- Brusca, R. C., Alvarez-Borrego, S., and Medellín, R. “Physical, Chemical, and Biological Oceanography of the Gulf of California.” In *The Gulf of California: Biodiversity and Conservation*. 24–48. University of Arizona Press, 2010. <http://www.jstor.org/stable/j.ctt181hwrc.6>.
- Cabello, A. M., Cornejo-Castillo, F. M., Raho, N., Blasco, D., Vidal, M., Audic, S., *et al.* (2016). Global distribution and vertical patterns of a prymnesiophyte-cyanobacteria obligate symbiosis. *ISME J.* 10, 693–706. doi:10.1038/ismej.2015.147.
- Cabello, A. M., Turk-Kubo, K. A., Hayashi, K., Jacobs, L., Kudela, R. M., and Zehr, J. P. (2020). Unexpected presence of the nitrogen-fixing symbiotic cyanobacterium UCYN-A in Monterey Bay, California. *J. Phycol.* 56, 1521–1533. doi:10.1111/jpy.13045.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., and Holmes, S. (2016). DADA 2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods.* 13, 581–583. doi:10.1038/nmeth.3869.
- Callahan, M. B., Callahan, A. B., McMurdie, P., and Holmes, S. (2021). Package ‘dada2’ v1.20.0: Accurate, high-resolution sample inference from amplicon sequencing data. <http://benjjneb.github.io/dada2/>.
- Capone, D. G., and Carpenter, E. J. (1982). Nitrogen fixation in the marine environment. *Science.* 217, 1140–1142. doi:0036-8075/82/0917-1140\$01.00/0.
- Capone, D. G., O’Neil, J. M., Zehr, J., and Carpenter, E. J. (1990). Basis for diel variation in nitrogenase activity in the marine planktonic cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3532–3536. doi:10.1128/aem.56.11.3532-3536.1990.
- Capone, D. G., Zehr, J. P., Paerl, H. W., Bergman, B., and Carpenter, E. J. (1997). *Trichodesmium*, a globally significant marine cyanobacterium. *Science.* 276, 1221–1229. doi:10.1126/science.276.5316.1221.
- Carpenter, E., and Romans, K. (1991). Major role of the cyanobacterium *Trichodesmium* in nutrient cycling in the North Atlantic Ocean. *Science.* 254, 1356–1358.
- Cepeda-Morales, J., Gaxiola-Castro, G., Beier, E., and Godínez, V. M. (2013). The mechanisms involved in defining the northern boundary of the shallow oxygen minimum zone in the Eastern Tropical Pacific Ocean off Mexico. *Deep. Sea Res.* 76, 1–12. doi:10.1016/j.dsr.2013.02.004.
- Chenn, H. (2018). Generate high resolution Venn and Euler plots. VennDiagram package v1.6.20. *R Packag.* <https://cran.r-project.org/web/packages/VennDiagram/VennDiagram.pdf>.
- Church, M. J., Jenkins, B. D., Karl, D. M., and Zehr, J. P. (2005a). Vertical distributions of nitrogen-fixing phylotypes at Stn ALOHA in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* 38, 3–14. doi:10.3354/ame038003.
- Church, M. J., Mahaffey, C., Letelier, R. M., Lukas, R., Zehr, J. P., and Karl, D. M. (2009). Physical forcing of nitrogen fixation and diazotroph community structure in the North Pacific Subtropical Gyre. *Global Biogeochem. Cycles.* 23: GB2020. doi:10.1029/2008GB003418.
- Church, M. J., Short, C. M., Jenkins, B. D., Karl, D. M., and Zehr, J. P. (2005b). Temporal Patterns of Nitrogenase Gene (*nifH*) Expression in the Oligotrophic North Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5362–5370. doi:10.1128/AEM.71.9.5362.
- Codispoti, L. A., Brandes, J. A., Christensen, J. P., Devol, A. H., Naqvi, S. W. A., Paerl, H. W., *et al.* (2001). The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets: Moving targets as we enter the anthropocene? *Sci. Mar.* 65, 85–105. doi:10.3989/scimar.2001.65s285.
- Cornejo-Castillo, F. M. (2017). Diversity, ecology and evolution of marine diazotrophic microorganisms. *Univ. Calif. St. CRUZ.* <http://hdl.handle.net/10261/164042>.
- Cornejo-Castillo, F. M., Cabello, A. M., Salazar, G., Sánchez-Baracaldo, P., Lima-Mendez, G., Hingamp, P., *et al.* (2016). Cyanobacterial symbionts diverged in the late Cretaceous towards lineage-specific nitrogen fixation factories in single-celled phytoplankton. *Nat. Commun.* 7:11071. doi:10.1038/ncomms11071.
- Cornejo-Castillo, F. M., Muñoz-Marín, M. del C., Turk-Kubo, K. A., Royo-Llonch, M., Farnelid, H., Acinas, S. G., *et al.* (2019). UCYN-A3, a newly characterized open ocean sublineage of the symbiotic N₂-fixing cyanobacterium *Candidatus Atelocyanobacterium thalassa*. *Environ. Microbiol.* 21, 111–124. doi:10.1111/1462-2920.14429.
- Damashek, J., and Francis, C. A. (2018). Microbial nitrogen cycling in estuaries: From genes to ecosystem processes. *Estuaries and Coasts.* 41, 626–660. doi:10.1007/s12237-017-0306-2.
- Deutsch, C., Key, R. M., Sarmiento, J. L., and Ganachaud, A. (2001). Denitrification and N₂ fixation in the Pacific Ocean. *Global Biogeochem. Cycles.* 15, 483–506. doi:10.1029/2000GB001291.
- Deutsch, C., Sarmiento, J. L., Sigman, D. M., Gruber, N., and Dunne, J. P. (2007). Spatial coupling of nitrogen

- inputs and losses in the ocean. *Nature*. 445, 163–167. doi:10.1038/nature05392.
- Dixon, R., Kahn, D., and Innes, J. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 621–631. doi:10.1038/nrmicro954.
- Dugdale, R. C., Menzel, D. W., and Ryther, J. H. (1961). Nitrogen fixation in the Sargasso Sea. *Deep Sea Res.* 7, 297–300. doi:10.1016/0146-6313(61)90051-X.
- Einsle, O., Tezcan, F. A., Andrade, S. L. A., and Rees, D. C. (2002). Nitrogenase MoFe-Protein at 1.16 Å resolution: A Central ligand in the FeMo-Cofactor nitrogenase. *Science*. 297, 1696–1700. doi:10.1126/ciencia.1073877.
- Eren, A. M., Maignien, L., Sul, W. J., Murphy, L. G., Grim, S. L., Morrison, H. G., *et al.* (2013). Oligotyping: Differentiating between closely related microbial taxa using 16S rRNA gene data. *Methods Ecol. Evol.* 4, 1111–1119. doi:10.1111/2041-210X.12114.
- Falkowski, P. (1997). Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the Ocean. *Nature*. 387, 272–275. doi:10.1038/255243a0.
- Fallik, E., Chan, Y., and Robert, L. (1991). Detection of alternative nitrogenases in aerobic gram-negative nitrogen-fixing bacteria. *J Bacteriol.* 173, 365–371. doi:10.1128/jb.173.1.365-371.1991.
- Farnelid, H., Andersson, A. F., Bertilsson, S., Al-Soud, W. A., Hansen, L. H., Sørensen, S., *et al.* (2001). Nitrogenase gene amplicons from global marine surface waters are dominated by genes of non-cyanobacteria. *PLoS One*. 6: e19223. doi:10.1371/journal.pone.0019223.
- Farnelid, H., Bentzon-Tilia, M., Andersson, A. F., Bertilsson, S., Jost, G., Labrenz, M., *et al.* (2013). Active nitrogen-fixing heterotrophic bacteria at and below the chemocline of the central Baltic Sea. *ISME J.* 7, 1413–1423. doi:10.1038/ismej.2013.26.
- Farnelid, H., Turk-Kubo, K., Del Carmen Muñoz-Marín, M., and Zehr, J. P. (2016). New insights into the ecology of the globally significant uncultured nitrogen-fixing symbiont UCYN-A. *Aquat. Microb. Ecol.* 77, 125–138. doi:10.3354/ame01794.
- Fernandez, C., Farías, L., and Ulloa, O. (2011). Nitrogen fixation in denitrified marine waters. *PLoS One*. 6: e20539. doi:10.1371/journal.pone.0020539.
- Fiedler, P. C., and Talley, L. D. (2006). Hydrography of the Eastern Tropical Pacific: A review. *Prog. Oceanogr.* 69, 143–180. doi:10.1016/j.pocean.2006.03.008.
- Foster, R. A., Kuypers, M. M. M., Vagner, T., Paerl, R. W., Musat, N., and Zehr, J. P. (2011). Nitrogen fixation and transfer in open ocean diatom-cyanobacterial symbioses. *ISME J.* 5, 1484–1493. doi:10.1038/ismej.2011.26.
- Foster, R. A., Subramaniam, A., Mahaffey, C., Carpenter, E. J., Capone, D. G., and Zehr, J. P. (2007). Influence of the Amazon River plume on distributions of free-living and symbiotic cyanobacteria in the Western Tropical North Atlantic Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 52, 517–532. doi:10.4319/lo.2007.52.2.0517.
- Foster, R. A., and Zehr, J. P. (2006). Characterization of diatom-cyanobacteria symbioses on the basis of *nifH*, *hetR* and 16S rRNA sequences. *Environ. Microbiol.* 8, 1913–1925. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01068.x.
- Friesen, L. W. Von, and Riemann, L. (2020). Nitrogen fixation in a changing Arctic Ocean : An overlooked source of nitrogen ?. *Front. Microbiol.* 11:596426. doi:10.3389/fmicb.2020.596426.
- Gaby, J. C., and Buckley, D. H. (2012). A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *PLoS One*. 7: e42149. doi:10.1371/journal.pone.0042149.
- Galloway, J. (2004). Nitrogen Cycles : Past , present , and future. *Biogeochemistry.* 70, 153–226. doi:10.1007/s10533-004-0370-0.
- Gandhi, N., Singh, A., Prakash, S., Ramesh, R., Raman, M., Sheshshayee, M. S., *et al.* (2011). First direct measurements of N₂ fixation during a *Trichodesmium* bloom in the Eastern Arabian Sea. *Global Biogeochem. Cycles* 25: GB4014. doi:10.1029/2010GB003970.
- Godínez, V. M., Beier, E., Lavín, M. F., and Kurczyn, J. A. (2010). Circulation at the entrance of the Gulf of California from satellite altimeter and hydrographic observations. *J. Geophys. Res. Ocean.* 115: C04007. doi:10.1029/2009JC005705.
- Grabowski, M. N. W., Church, M. J., and Karl, D. M. (2008). Nitrogen fixation rates and controls at Stn ALOHA. *Aquat. Microb. Ecol.* 52, 175–183. doi:10.3354/ame01209.
- Gradoville, M. R., Bombar, D., Crump, B. C., Letelier, R. M., Zehr, J. P., and White, A. E. (2017). Diversity and activity of nitrogen-fixing communities across ocean basins. *Limnol. Oceanogr.* 62, 1895–1909. doi:10.1002/lno.10542.
- Gradoville, M. R., Cabello, A. M., Wilson, S. T., Turk-kubo, K. A., Karl, D. M., and Zehr, J. P. (2021). Light and depth dependency of nitrogen fixation by the non-photosynthetic , symbiotic cyanobacterium UCYN-

- A. *Environ. Microbiol.* 23, 4518–4531. doi:10.1111/1462-2920.15645.
- Grasshoff, K., Kremling, K., and Ehrhardt, M. (2009). Methods of seawater analysis. Third Edition. *Mar. Chem. WILEY-VCH*. doi:10.1016/0304-4203(78)90045-2.
- Gray, J. S., Wu, R. S. S., and Ying, Y. O. (2002). Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 238, 249–279. doi:10.3354/meps238249.
- Großkopf, T., Mohr, W., Baustian, T., Schunck, H., Gill, D., Kuypers, M. M. M., *et al.* (2012). Doubling of marine dinitrogen-fixation rates based on direct measurements. *Nature*. 488, 361–364. doi:10.1038/nature11338.
- Gruber, N. (2008). Nitrogen in the Marine Environment (Second Edition). The Marine Nitrogen Cycle: Overview and Challenges. *Academic Press*. doi:10.1016/B978-0-12-372522-6.00001-3.
- Gruber, N. (2016). Elusive marine nitrogen fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 4246–4248. doi:10.1073/pnas.1603646113.
- Hadley Wickham, Romain François, Lionel Henry, and Kirill Müller (2020). A grammar of data manipulation: R package dplyr v1.0.7. <https://dplyr.tidyverse.org>.
- Hagino, K., Onuma, R., Kawachi, M., and Horiguchi, T. (2013). Discovery of an endosymbiotic nitrogen-fixing cyanobacterium UCYN-A in *Braarudosphaera bigelowii* (Prymnesiophyceae). *PLoS One*. 8: e81749. doi:10.1371/journal.pone.0081749.
- Hall, T. (2001). BioEdit Help Contents v5.0.6. *Department of Microbiology*, North Carolina State University, Raleigh. <https://bioedit.software.informer.com/5.0/>.
- Halm, H., Lam, P., Ferdelman, T. G., Lavik, G., Dittmar, T., Laroche, J., *et al.* (2012). Heterotrophic organisms dominate nitrogen fixation in the South Pacific Gyre. *ISME J.* 6, 1238–1249. doi:10.1038/ismej.2011.182.
- Hammersley, M. R., Turk, K. A., Leinweber, A., Gruber, N., Zehr, J. P., Gunderson, T., *et al.* (2011). Nitrogen fixation within the water column associated with two hypoxic basins in the Southern California Bight. *Aquat. Microb. Ecol.* 63, 193–205. doi:10.3354/ame01494.
- Heller, P. (2014). Bioinformatic investigations in marine microbial ecology. *Univ. Calif. St. CRUZ*. <https://escholarship.org/uc/item/61q69869>.
- Helly, J. J., and Levin, L. A. (2004). Global distribution of naturally occurring marine hypoxia on continental margins. *Deep. Sea Res.* 51, 1159–1168. doi:10.1016/j.dsr.2004.03.009.
- Henke, B. A., Turk-Kubo, K. A., Bonnet, S., and Zehr, J. P. (2018). Distributions and abundances of sublineages of the N₂-fixing cyanobacterium *Candidatus Atelocyanobacterium thalassa* (UCYN-A) in the New Caledonian coral lagoon. *Front. Microbiol.* 9:554. doi:10.3389/fmicb.2018.00554.
- Hewson, I., Moisaner, P. H., Morrison, A. E., and Zehr, J. P. (2007). Diazotrophic bacterioplankton in a coral reef lagoon: Phylogeny, diel nitrogenase expression and response to phosphate enrichment. *ISME J.* 1, 78–91. doi:10.1038/ismej.2007.5.
- Hofmann, A. F., Peltzer, E. T., Walz, P. M., and Brewer, P. G. (2011). Hypoxia by degrees: Establishing definitions for a changing ocean. *Deep. Sea Res.* 58, 1212–1226. doi:10.1016/j.dsr.2011.09.004.
- Howard, J. B., and Rees, D. C. (1996). Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. *Chem. Rev.* 96, 2965–2982. doi: 10.1021/cr9500545.
- Howarth, R. W., Marino, R., and Lane, J. (1988). Nitrogen fixation in freshwater , estuarine , and marine ecosystems. Rates and importance. *Limnol. Oceanogr.* 33, 669–687. doi:10.4319/lo.1988.33.4part2.0669.
- Hsieh, T. C., Ma, K. H., and Chao, A. (2016). iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods Ecol. Evol.* 7, 1451–1456. doi:10.1111/2041-210X.12613.
- Jahson, S., Rai, A. N., and Bergman, B. (1995). Intracellular cyanobiont *Richelia intracellularis*: ultrastructure and immuno-localisation of phycoerythrin, nitrogenase, Rubisco and glutamine synthetase. *Mar. Biol.* 124, 1–8. doi:10.1007/BF00349140.
- Jayakumar, A., Al-Rshaidat, M. M. D., Ward, B. B., and Mulholland, M. R. (2012). Diversity, distribution, and expression of diazotroph *nifH* genes in oxygen -deficient waters of the Arabian Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 597–606. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01430.x.
- Jayakumar, A., Chang, B. X., Widner, B., Bernhardt, P., Mulholland, M. R., and Ward, B. B. (2017). Biological nitrogen fixation in the oxygen -minimum region of the Eastern Tropical North Pacific ocean. *ISME J.* 11, 2356–2367. doi:10.1038/ismej.2017.97.
- Jickells, T. D., Buitenhuis, E., Altieri, K., Baker, A. R., Capone, D., Duce, R. A., *et al.* (2017). A reevaluation of the magnitude and impacts of anthropogenic atmospheric nitrogen inputs on the ocean. *Global Biogeochem. Cycles*. 31, 289–305. doi:10.1002/2016GB005586.
- Karl, D., Michaels, A., and Bergman, B. (2002). Dinitrogen Fixat. world's Ocean. *Biogeochemistry*. 57/58: 47–

98. doi:10.1007/978-94-017-3405-9.
- Kirkpatrick, J., Oakley, B., Fuchsman, C., Srinivasan, S., Staley, J. T., and Murray, J. W. (2006). Diversity and distribution of *Planctomycetes* and related bacteria in the suboxic zone of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3079–3083. doi:10.1128/AEM.72.4.3079-3083.2006.
- Krupke, A., Mohr, W., Laroche, J., Fuchs, B. M., Amann, R. I., and Kuypers, M. M. M. (2015). The effect of nutrients on carbon and nitrogen fixation by the UCYN-A-haptophyte symbiosis. *ISME J.* 9, 1635–1647. doi:10.1038/ismej.2014.253.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096.
- Kurczyn, J. A., Beier, E., Lavín, M. F., and Chaigneau, A. (2012). Mesoscale eddies in the North Eastern Pacific tropical-subtropical transition zone: Statistical characterization from satellite altimetry. *J. Geophys. Res. Ocean.* 117: C10021. doi:10.1029/2012JC007970.
- Lam, P., and Kuypers, M. M. M. (2011). Microbial nitrogen cycling processes in oxygen minimum zones. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 3, 317–345. doi:10.1146/annurev-marine-120709-142814.
- Lam, P., Lavik, G., Jensen, M. M., van de Vossenberg, J., Schmid, M., Woebken, D., et al. (2009). Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 4752–4757. doi:10.1073/pnas.0812444106.
- Langlois, R. J., Hümmer, D., and LaRoche, J. (2008). Abundances and distributions of the dominant *nifH* phylotypes in the Northern Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1922–1931. doi:10.1128/AEM.01720-07.
- Langlois, R. J., LaRoche, J., and Raab, P. A. (2005). Diazotrophic diversity and distribution in the Tropical and Subtropical Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7910–7919. doi:10.1128/AEM.71.12.7910.
- Langlois, R. J., Mills, M. M., Ridame, C., Croot, P., and LaRoche, J. (2012). Diazotrophic bacteria respond to Saharan dust additions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 470, 1–14. doi:10.3354/meps10109.
- Letunic, I., and Bork, P. (2016). Interactive tree of life (iTOL) v3 : An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. 44, 242–245. doi:10.1093/nar/gkw290.
- Li, Y. Y., Chen, X. H., Xie, Z. X., Li, D. X., Wu, P. F., Kong, L. F., et al. (2018). Bacterial diversity and nitrogen utilization strategies in the upper layer of the Northwestern Pacific Ocean. *Front. Microbiol.* 9:797. doi:10.3389/fmicb.2018.00797.
- Loescher, C. R., Großkopf, T., Desai, F. D., Gill, D., Schunck, H., Croot, P. L., et al. (2014). Facets of diazotrophy in the oxygen minimum zone waters off Peru. *ISME J.* 8, 2180–2192. doi:10.1038/ismej.2014.71.
- Long, A. M., Jurgensen, S. K., Petchel, A. R., Savoie, E. R., and Brum, J. R. (2021). Microbial ecology of oxygen minimum zones amidst ocean deoxygenation. *Front. Microbiol.* 12:748961. doi:10.3389/fmicb.2021.748961.
- Löscher, C. R., Mohr, W., Bange, H. W., and Canfield, D. E. (2020). No nitrogen fixation in the Bay of Bengal? *Biogeosciences* 17, 851–864. doi:10.5194/bg-17-851-2020.
- Luo, Y. W., Doney, S. C., Anderson, L. A., Benavides, M., Berman-Frank, I., Bode, A., et al. (2012). Database of diazotrophs in global ocean: Abundance, biomass and nitrogen fixation rates. *Earth Syst. Sci. Data.* 4, 47–73. doi:10.5194/essd-4-47-2012.
- Martínez-Pérez, C., Mohr, W., Löscher, C. R., Dekaezemacker, J., Littmann, S., Yilmaz, P., et al. (2016). The small unicellular diazotrophic symbiont, UCYN-A, is a key player in the marine nitrogen cycle. *Nat. Microbiol.* 1: 16163. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.163.
- Maske, H., Cajal Medrano, R., Trasviñ Castro, A., Jiménez Mercado, A., Almeda Jauregui, C. O., Gaxiola Castro, G., et al. (2010). Inorganic carbon and biological oceanography above a shallow oxygen minimum in the entrance to the Gulf of California in the Mexican Pacific. *Limnol. Ocean.* 55, 481–491. doi:10.4319/lo.2010.55.2.0481.
- Mazard, S. L., Fuller, N. J., Orcutt, K. M., Bridle, O., and Scanlan, D. J. (2004). PCR analysis of the distribution of unicellular cyanobacterial diazotrophs in the Arabian Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7355–7364. doi:10.1128/AEM.70.12.7355-7364.2004.
- McMurdie, P. J., and Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One.* 8: e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217.
- Mehta, M. P., Butterfield, D. A., and Baross, J. A. (2003). Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 960–970. doi:10.1128/AEM.69.2.960.
- Messer, L. F., Doubell, M., Jeffries, T. C., Brown, M. V., and Seymour, J. R. (2015). Prokaryotic and

- diazotrophic population dynamics within a large oligotrophic inverse estuary. *Aquat. Microb. Ecol.* 74, 1–15. doi:10.3354/ame01726.
- Mills, M. M., Turk-Kubo, K. A., van Dijken, G. L., Henke, B. A., Harding, K., Wilson, S. T., *et al.* (2020). Unusual marine cyanobacteria/haptophyte symbiosis relies on N₂ fixation even in N-rich environments. *ISME J.* 14, 2395–2406. doi:10.1038/s41396-020-0691-6.
- Moisander, P. H., Beinart, R. A., Hewson, I., White, A. E., Johnson, K. S., Carlson, C. A., *et al.* (2010). Unicellular cyanobacterial distributions broaden the oceanic N₂ fixation domain. *Science.* 327, 1512–1514. doi:10.1126/science.1185468.
- Monteiro, F. M., Follows, M. J., and Dutkiewicz, S. (2010). Distribution of diverse nitrogen fixers in the global ocean. *Global Biogeochem. Cycles.* 24: GB3017. doi:10.1029/2009GB003731.
- Montoya, J. P., Holl, C. M., Zehr, J. P., Hansen, A., Villareal, T. A., and Capone, D. G. (2004). High rates of N₂ fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature.* 430, 1027–1031. doi:10.1038/nature02824.
- Moreira-Coello, V., Mouriño-carballido, B., and Marañón, E. (2017). Biological N₂ fixation in the upwelling region off NW Iberia: Magnitude, relevance, and players. *Front. Mar. Sci.* 4:303. doi:10.3389/fmars.2017.00303.
- Moreira-Coello, V., Mouriño-Carballido, B., Marañón, E., Fernández-Carrera, A., Bode, A., Sintés, E., *et al.* (2019). Temporal variability of diazotroph community composition in the upwelling region off NW Iberia. *Sci. Rep.* 9:3737. doi:10.1038/s41598-019-39586-4.
- Moynihan, M. A. (2020). moyn413/nifHdada2: nifH dada2 beta version (v1.0.1). doi:10.5281/ZENODO.3958370.
- Mulholland, M. R., Bernhardt, P. W., Blanco-Garcia, J. L., Mannino, A., Hyde, K., Mondragon, E., *et al.* (2012). Rates of dinitrogen fixation and the abundance of diazotrophs in North American coastal waters between Cape Hatteras and Georges Bank. *Limnol. Oceanogr.* 57, 1067–1083. doi:10.4319/lo.2012.57.4.1067.
- Mulholland, M. R., and Capone, D. G. (2009). Dinitrogen fixation in the Indian Ocean. *Geophys. Monogr. Ser.* 185, 167–186. doi:10.1029/2009GM000850.
- Muñoz-Marín, M. D. C., Shilova, I. N., Shi, T., Farnelid, H., Cabello, A. M., and Zehr, J. P. (2019). The transcriptional cycle is suited to daytime N₂ fixation in the unicellular cyanobacterium “*Candidatus atelocyanobacterium thalassa*” (UCYN-A). *MBio.* 10:e02495-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02495-18>.
- Neveux, J., Lantoiné, F., Vaultot, D., Marie, D., and Blanchot, J. (1999). Phycoerythrins in the southern tropical and Equatorial Pacific Ocean: Evidence for new cyanobacterial types. *J. Geophys. Res. Ocean.* 104, 3311–3321. doi:10.1029/98jc02000.
- Norris, R. E. 1961. Observations on phytoplankton organisms collected on the NZOI Pacific cruise, September 1958. *N.Z. J. Sci.* 4:162–88.
- Oksanen, A. J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., *et al.* (2020). Package ‘vegan’: Community ecology package v2.5-7. <https://github.com/vegandevs/vegan>.
- Olson, N. D., Ainsworth, T. D., Gates, R. D., and Takabayashi, M. (2009). Diazotrophic bacteria associated with Hawaiian Montipora corals: Diversity and abundance in correlation with symbiotic dinoflagellates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 371, 140–146. doi:10.1016/j.jembe.2009.01.012.
- Pajares, S., and Ramos, R. (2019). Processes and microorganisms involved in the marine nitrogen cycle: Knowledge and gaps. *Front. Mar. Sci.* 6:739. doi:10.3389/fmars.2019.00739.
- Pajares, S., Soto-Jiménez, M. F., and Merino-Ibarra, M. (2019). Molecular and isotopic evidence of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities in the oxygen minimum zone of the Tropical Mexican Pacific. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95: fiz143. doi:10.1093/femsec/fiz143.
- Pajares, S., Varona-Cordero, F., and Hernández-Becerril, D. U. (2020). Spatial distribution patterns of bacterioplankton in the oxygen minimum zone of the Tropical Mexican Pacific. *Microb. Ecol.* 80, 519–536. doi:10.1007/s00248-020-01508-7.
- Paulmier, A., and Ruiz-Pino, D. (2009). Oxygen minimum zones (OMZs) in the modern ocean. *Prog. Oceanogr.* 80, 113–128. doi:10.1016/j.pocean.2008.08.001.
- Ploner, A. (2018). Creating heatmaps using package Heatplus v 3.3.0. <https://github.com/alexploner/Heatplus>.
- Pogoreutz, C., Rädicker, N., Cárdenas, A., Gärdes, A., Wild, C., and Voolstra, C. R. (2017). Nitrogen fixation aligns with *nifH* abundance and expression in two coral trophic functional groups. *Front. Microbiol.* 8:1187. doi:10.3389/fmicb.2017.01187.
- Portela, E., Beier, E., Barton, E. D., Castro, R., Godínez, V., Palacios-Hernández, E., *et al.* (2016). Water masses and circulation in the Tropical Pacific off Central Mexico and surrounding areas. *J. Phys. Oceanogr.* 46,

- 3069–3081. doi:10.1175/JPO-D-16-0068.1.
- Rabalais, N. N., Díaz, R. J., Levin, L. A., Turner, R. E., Gilbert, D., and Zhang, J. (2010). Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. *Biogeosciences*. 7, 585–619. doi:10.5194/bg-7-585-2010.
- Ridame, C., Dinasquet, J., Hallstrøm, S., Bigeard, E., Riemann, L., Van, F., *et al.* (2022). N₂ fixation in the Mediterranean Sea related to the composition of the diazotrophic community, and impact of dust under present and future environmental conditions. *Biogeosciences*. 19, 415–435. doi:10.5194/bg-19-415-2022.
- Riemann, L., Farnelid, H., and Steward, G. F. (2010). Nitrogenase genes in non-cyanobacterial plankton: Prevalence, diversity and regulation in marine waters. *Aquat. Microb. Ecol.* 61, 235–247. doi:10.3354/ame01431.
- Saunders, J. (2003). Some like it hot. *Nat Rev Microbiol.* 1, 172. doi:10.1038/nrmicro789.
- Schlitzer, R. (2002). Interactive analysis and visualization of geoscience data with Ocean Data View. *Comput. Geosci.* 28, 1211–1218. doi:10.1016/S0098-3004(02)00040-7.
- Serrano, D. (2012). La zona del mínimo de oxígeno en el Pacífico mexicano. *Biodivers. y comunidades del talud Cont. del Pacífico Mex.*, 105–119.
- Shi, T., Sun, Y., and Falkowski, P. G. (2007). Effects of iron limitation on the expression of metabolic genes in the marine cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* IMS101. *Environ. Microbiol.* 9, 2945–2956. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01406.x.
- Shiozaki, T., Bombar, D., Riemann, L., Hashihama, F., Takeda, S., Yamaguchi, T., *et al.* (2017). Basin scale variability of active diazotrophs and nitrogen fixation in the North Pacific, from the tropics to the subarctic Bering Sea. *Global Biogeochem. Cycles*. 31, 996–1009. doi:10.1002/2017GB005681.
- Shiozaki, T., Fujiwara, A., Inomura, K., Hirose, Y., Hashihama, F., and Harada, N. (2020). Biological nitrogen fixation detected under Antarctic Sea ice. *Nat. Geosci.* 13, 729–732. doi:10.1038/s41561-020-00651-7.
- Shiozaki, T., Kodama, T., Kitajima, S., Sato, M., and Furuya, K. (2013). Advective transport of diazotrophs and importance of their nitrogen fixation on new and primary production in the Western Pacific warm pool. *Limnol. Oceanogr.* 58, 49–60. doi:10.4319/lo.2013.58.1.0049.
- Singh, A., Gandhi, N., and Ramesh, R. (2012). Contribution of atmospheric nitrogen deposition to new production in the nitrogen limited photic zone of the Northern Indian Ocean. *J. Geophys. Res. Ocean.* 117: C06004. doi:10.1029/2011JC007737.
- Smethie, W. M. (1987). Nutrient regeneration and denitrification in low oxygen fjords. *Deep Sea Res.* 34, 983–1006. doi:10.1016/0198-0149(87)90049-5.
- Sohm, J. A., Hilton, J. A., Noble, A. E., Zehr, J. P., Saito, M. A., and Webb, E. A. (2011a). Nitrogen fixation in the South Atlantic Gyre and the Benguela Upwelling System. *Geophys. Res. Lett.* 38: L16608. doi:10.1029/2011GL048315.
- Sohm, J. A., Webb, E. A., and Capone, D. G. (2011b). Emerging patterns of marine nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 499–508. doi:10.1038/nrmicro2594.
- Stal, L. J. (2009). Is the distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria in the oceans related to temperature?. *Environ. Microbiol.* 11, 1632–1645. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00016.x.
- Stenegren, M., Caputo, A., Berg, C., Bonnet, S., and Foster, R. A. (2018). Distribution and drivers of symbiotic and free-living diazotrophic cyanobacteria in the Western Tropical South Pacific. *Biogeosciences* 15, 1559–1578. doi:10.5194/bg-15-1559-2018.
- Steward, G. F., Zehr, J. P., Jellison, R., Montoya, J. P., and Hollibaugh, J. T. (2004). Vertical distribution of nitrogen-fixing phylotypes in a meromictic, hypersaline lake. *Microb. Ecol.* 47, 30–40. doi:10.1007/s00248-003-1017-8.
- Tang, W., Cerdán-García, E., Berthelot, H., Polyviou, D., Wang, S., Baylay, A., *et al.* (2020). New insights into the distributions of nitrogen fixation and diazotrophs revealed by high-resolution sensing and sampling methods. *ISME J.* 14, 2514–2526. doi:10.1038/s41396-020-0703-6.
- Thompson, A., Carter, B. J., Turk-Kubo, K., Malfatti, F., Azam, F., and Zehr, J. P. (2014). Genetic diversity of the unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria UCYN-A and its prymnesiophyte host. *Environ. Microbiol.* 16, 3238–3249. doi:10.1111/1462-2920.12490.
- Thompson, A. W., Foster, R. A., Krupke, A., Carter, B. J., Musat, N., Vaultot, D., *et al.* (2012). Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. *Science*. 337, 1546–1550. doi:10.1126/science.1222700.
- Thompson, A. W., and Zehr, J. P. (2013). Cellular Interactions: Lessons from the nitrogen-fixing cyanobacteria. *J. Phycol.* 49, 1024–1035. doi:10.1111/jpy.12117.
- Tripp, H. J., Bench, S. R., Turk, K. A., Foster, R. A., Desany, B. A., Niazi, F., *et al.* (2010). Metabolic

- streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium. *Nature*. 464, 90–94. doi:10.1038/nature08786.
- Turk-Kubo, K. A., Achilles, K. M., Serros, T. R. C., Ochiai, M., Montoya, J. P., and Zehr, J. P. (2012). Nitrogenase (*nifH*) gene expression in diazotrophic cyanobacteria in the Tropical North Atlantic in response to nutrient amendments. *Front. Microbiol.* 3: 386. doi:10.3389/fmicb.2012.00386.
- Turk-Kubo, K. A., Connell, P., Caron, D., Hogan, M. E., Farnelid, H. M., and Zehr, J. P. (2018). In situ diazotroph population dynamics under different resource ratios in the North Pacific Subtropical Gyre. *Front. Microbiol.* 9: 1616. doi:10.3389/fmicb.2018.01616.
- Turk-Kubo, K. A., Farnelid, H. M., Shilova, I. N., Henke, B., and Zehr, J. P. (2017). Distinct ecological niches of marine symbiotic N₂-fixing cyanobacterium *Candidatus Atelocyanobacterium thalassa* sublineages. *J. Phycol.* 53, 451–461. doi:10.1111/jpy.12505.
- Turk-Kubo, K. A., Frank, I. E., Hogan, M. E., Desnues, A., Bonnet, S., and Zehr, J. P. (2015). Diazotroph community succession during the VAHINE mesocosm experiment (New Caledonia lagoon). *Biogeosciences*. 12, 7435–7452. doi:10.5194/bg-12-7435-2015.
- Turk-Kubo, K. A., Karamchandani, M., Capone, D. G., and Zehr, J. P. (2014). The paradox of marine heterotrophic nitrogen fixation: Abundances of heterotrophic diazotrophs do not account for nitrogen fixation rates in the Eastern Tropical South Pacific. *Environ. Microbiol.* 16, 3095–3114. doi:10.1111/1462-2920.12346.
- Turk-Kubo, K. A., Mills, M. M., Arrigo, K. R., van Dijken, G., Henke, B. A., Stewart, B., *et al.* (2021). UCYN-A/haptophyte symbioses dominate N₂ fixation in the Southern California Current System. *ISME Commun.* 1:42. doi:10.1038/s43705-021-00039-7.
- Turk, K. A., Rees, A. P., Zehr, J. P., Pereira, N., Swift, P., Shelley, R., *et al.* (2011). Nitrogen fixation and nitrogenase (*nifH*) expression in tropical waters of the Eastern North Atlantic. *ISME J.* 5, 1201–1212. doi:10.1038/ismej.2010.205.
- Ulloa, O., Canfield, D. E., DeLong, E. F., Letelier, R. M., and Stewart, F. J. (2012). Microbial oceanography of anoxic oxygen minimum zones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 15996–16003. doi:10.1073/pnas.1205009109.
- Vitousek, P. M., and Howarth, R. W. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry*. 13, 87–115. doi:10.1007/BF00002772.
- Waksman, S. A., Hotchkiss, M., and Carey, C. L. (1933). Marine bacteria and their role in the cycle of life in the sea. Bacteria concerned in the cycle of nitrogen in the sea. *MBL, Mar. Biol. Lab.* 65, 137–167.
- Wen, Z., Lin, W., Shen, R., Hong, H., Kao, S. J., and Shi, D. (2017). Nitrogen fixation in two coastal upwelling regions of the Taiwan Strait. *Sci. Rep.* 7: 17601. doi:10.1038/s41598-017-18006-5.
- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T. L., Takahashi, K., Wilke, C., *et al.* (2020). Package ‘ggplot2’ v3.3.3: Create elegant data visualisations using the grammar of graphics. <https://ggplot2.tidyverse.org/>.
- Wright, J. J., Konwar, K. M., and Hallam, S. J. (2012). Microbial ecology of expanding oxygen minimum zones. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 381–394. doi:10.1038/nrmicro2778.
- Zani, S., Mellon, M. T., Collier, J. L., and Zehr, J. P. (2000). Expression of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3119–3124. doi:10.1128/AEM.66.7.3119-3124.2000.
- Zeev, E. B., Yogev, T., Man-Aharonovich, D., Kress, N., Herut, B., Bèjà, O., *et al.* (2008). Seasonal dynamics of the endosymbiotic, nitrogen-fixing cyanobacterium *Richelia intracellularis* in the Eastern Mediterranean Sea. *ISME J.* 2, 911–923. doi:10.1038/ismej.2008.56.
- Zehr, J. P. (2011). Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. *Trends Microbiol.* 19, 162–173. doi:10.1016/j.tim.2010.12.004.
- Zehr, J. P., Bench, S. R., Carter, B. J., Hewson, I., Niazi, F., Shi, T., *et al.* (2008). Globally distributed uncultivated. *Science*. 322, 1110–1112. doi:10.1126/science.1165340.
- Zehr, J. P., Crumbliss, L. L., Church, M. J., Omoregie, E. O., and Jenkins, B. D. (2003). Nitrogenase genes in PCR and RT-PCR reagents: Implications for studies of diversity of functional genes. *Biotechniques*. 35, 996–1005. doi:10.2144/03355st08.
- Zehr, J. P., and Kudela, R. M. (2011). Nitrogen cycle of the open ocean: From genes to ecosystems. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 3, 197–225. doi:10.1146/annurev-marine-120709-142819.
- Zehr, J. P., and McReynolds, L. A. (1989). Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2522–2526. doi:10.1128/aem.55.10.2522-2526.1989.
- Zehr, J. P., Mellon, M. T., and Zani, S. (1998). Erratum: New nitrogen-fixing microorganisms detected in

- oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3444–3450. doi: 10.1128/AEM.64.12.5067-5067.1998.
- Zehr, J. P., Shilova, I. N., Farnelid, H. M., Muñoz-Maríncarmen, M. D. C., and Turk-Kubo, K. A. (2016). Unusual marine unicellular symbiosis with the nitrogen-fixing cyanobacterium UCYN-A. *Nat. Microbiol.* 2: 16214. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.214.
- Zehr, J. P., Waterbury, J. B., Turner, P. J., Montoya, J. P., Omoregie, E., Steward, G. F., *et al.* (2001). Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the Subtropical North Pacific Ocean. *Nature.* 412, 635–638. doi:10.1038/35088063.
- Zhang, R., Chen, M., Yang, Q., Lin, Y., Mao, H., Qiu, Y., *et al.* (2015). Physical-biological coupling of N₂ fixation in the Northwestern South China Sea coastal upwelling during summer. *Limnol. Oceanogr.* 60, 1411–1425. doi:10.1002/lno.10111.

12. MATERIAL SUPLEMENTARIO

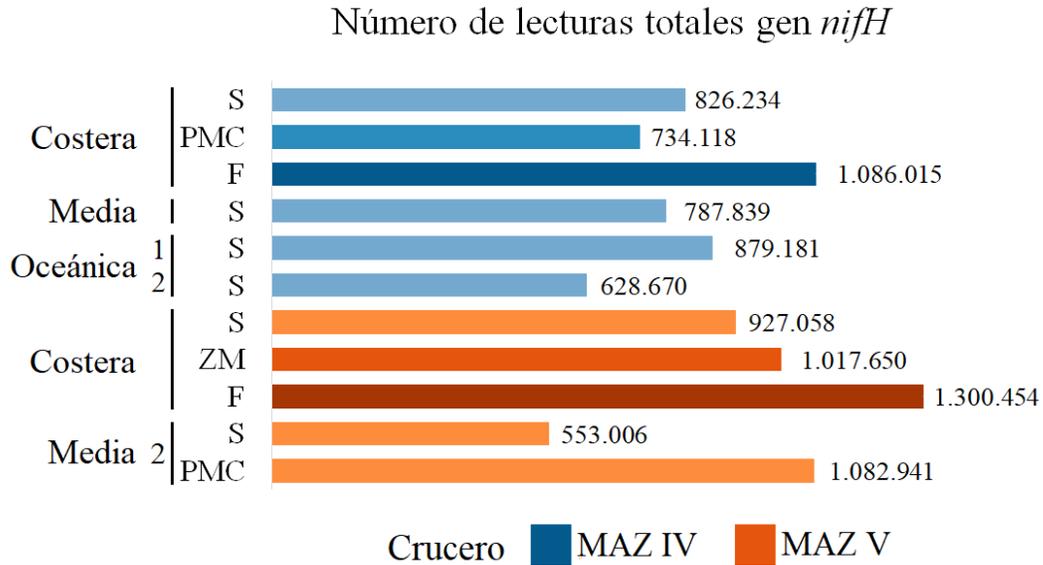


Figura S1. Número de lecturas obtenidas por muestra en la secuenciación por Illumina. Las muestras se encuentran ordenadas por estación y profundidad (diferentes tonalidades de color), resaltadas por crucero (MAZ IV=Azul, MAZ V=Naranja). De lado izquierdo se denotan las distintas estaciones= costera, media y oceánica. Abreviaturas: profundidades: S= superficie, PMC= primer máximo de clorofila, F= fondo, ZM= zona mezclada.

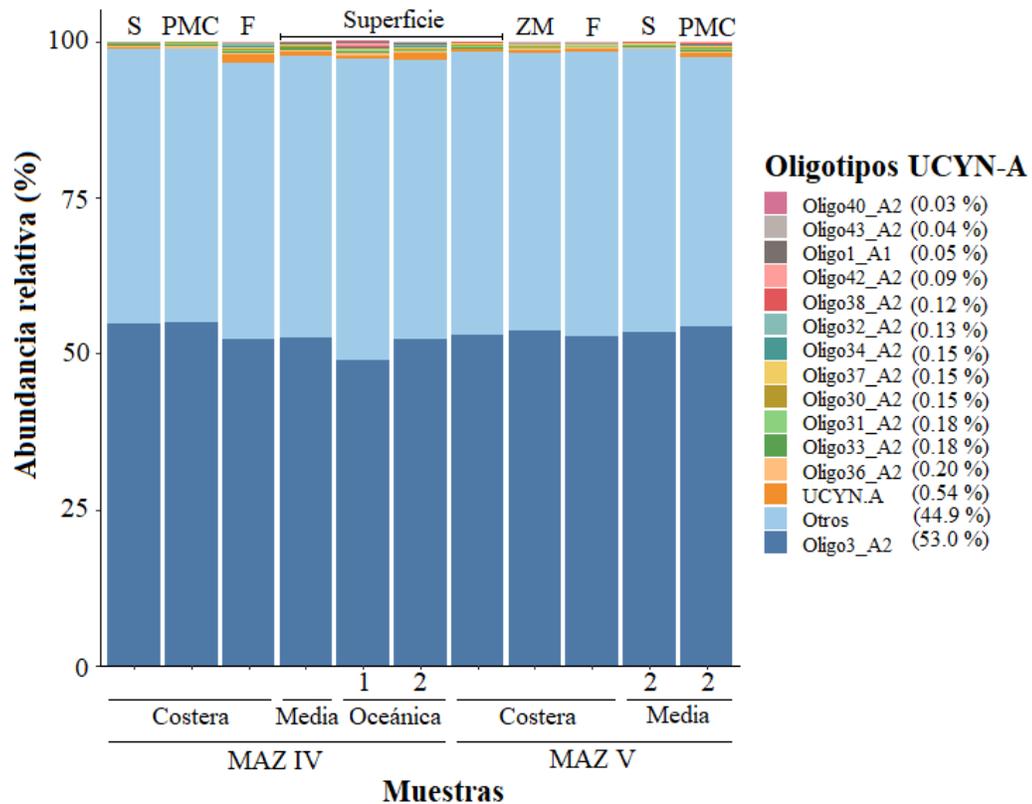


Figura S2. Abundancia relativa del gen *nifH* UCYN-A del total de las secuencias asignadas a distintos oligotipos del gen *nifH*-UCYN-A en las 11 muestras. “Otros” se refiere a secuencias de ASVs no clasificadas. En el eje x se denotan los distintos cruceros= MAZ IV o MAZ V, las estaciones= costera, media y oceánica, y el número de estación. Arriba de cada barra se señala la profundidad: S= superficie, PMC= primer máximo de clorofila, F= fondo y ZM= zona mezclada.

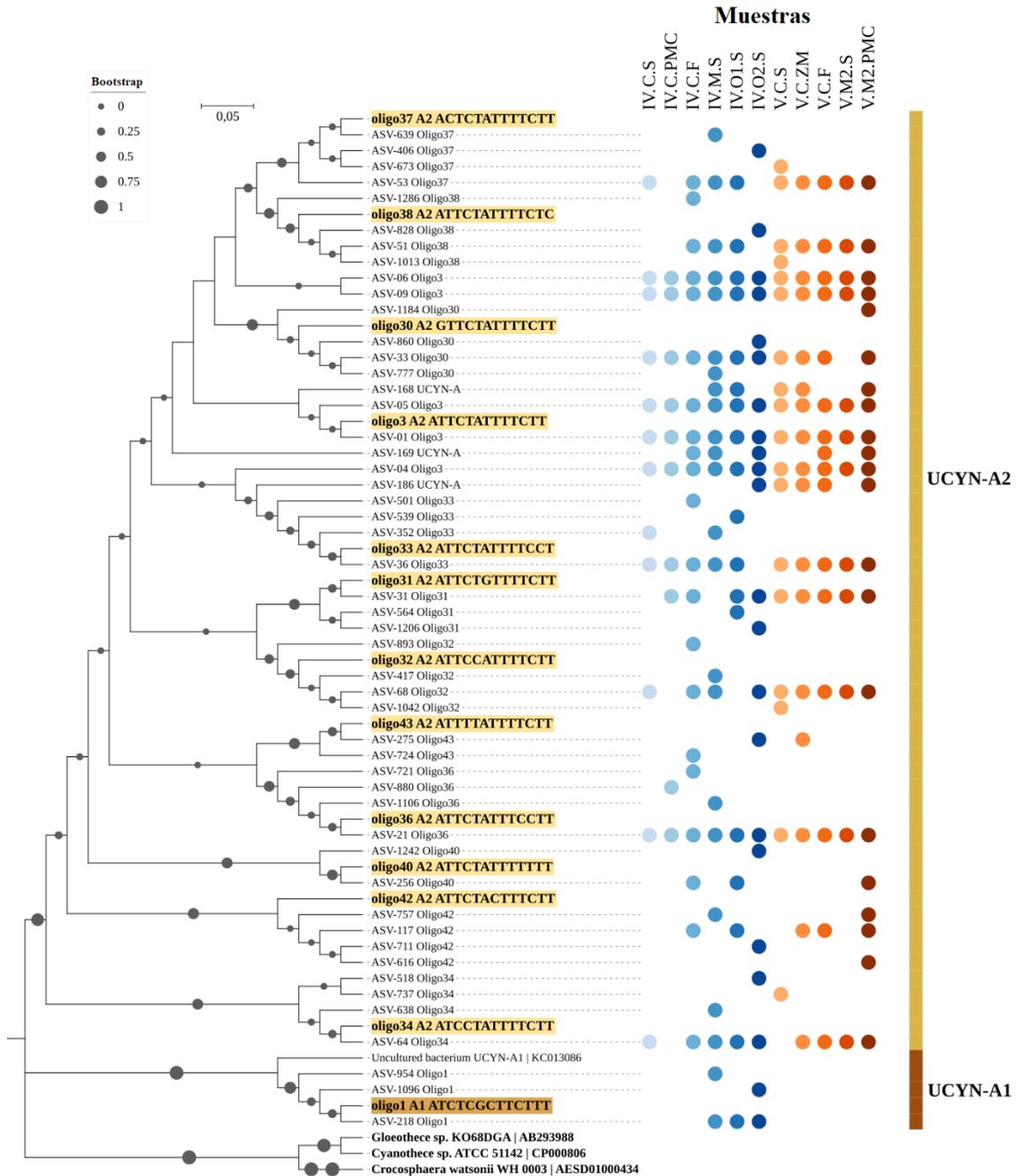


Figura S3. Árbol filogenético de los 50 ASVs representantes más abundantes de UCYN-A obtenido por el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei. El valor de bootstrap aparece en los nodos con un círculo gris. A la derecha, los colores en la gráfica denotan la presencia o ausencia de cada ASV en las 11 muestras. El color de las barras verticales y de las etiquetas indica el sublinaje correspondiente: Color arena para UCYN-A2 y café para UCYN-A1. Asimismo, el color de las etiquetas resaltadas en el árbol indica los diferentes oligotipos de cada sublinaje. Se usaron 13 secuencias de oligotipos de referencia y 3 de referencia de cianobacterias unicelulares estrechamente relacionadas (UCYN-B, UCYN-C).

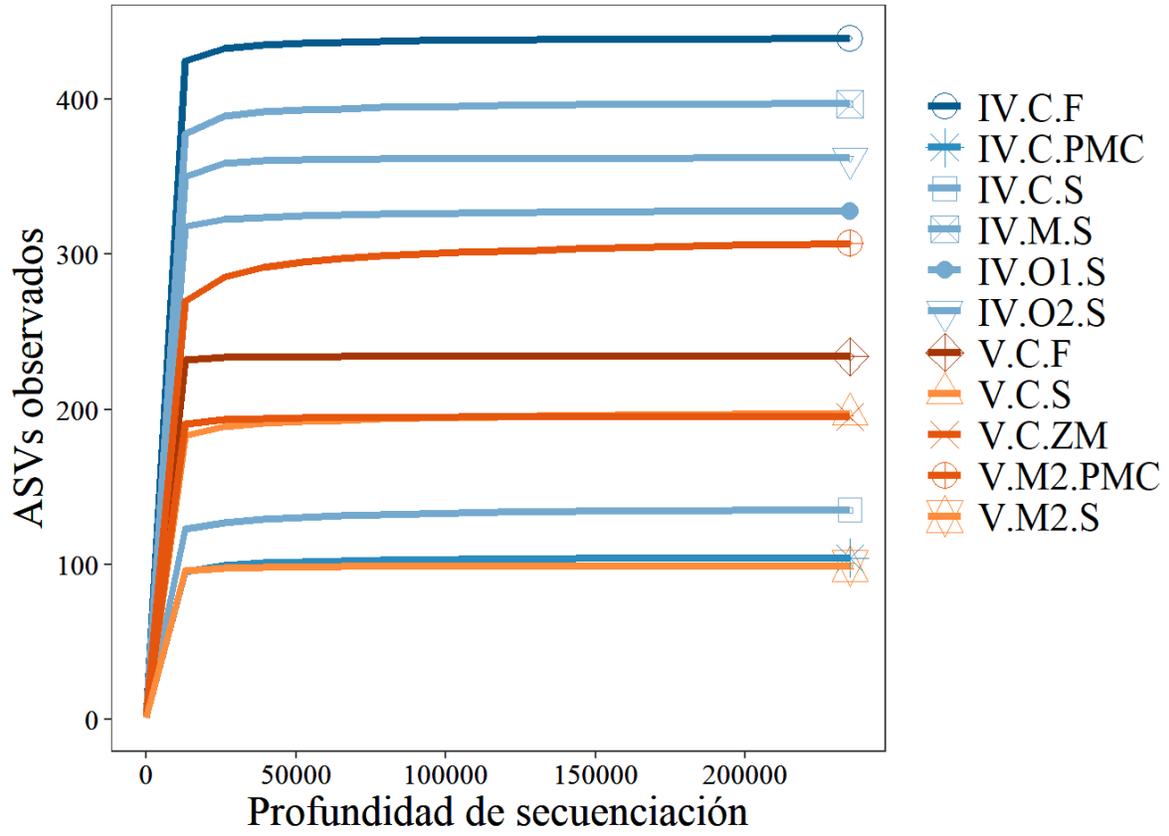


Figura S4. Curvas de rarefacción de las ASVs obtenidas en función de las secuencias. Se indican las once muestras con etiquetas, los dos cruceros con diferente color (MAZ IV=Azul, MAZ V=Naranja) y las tres profundidades con diferentes tonalidades de color.

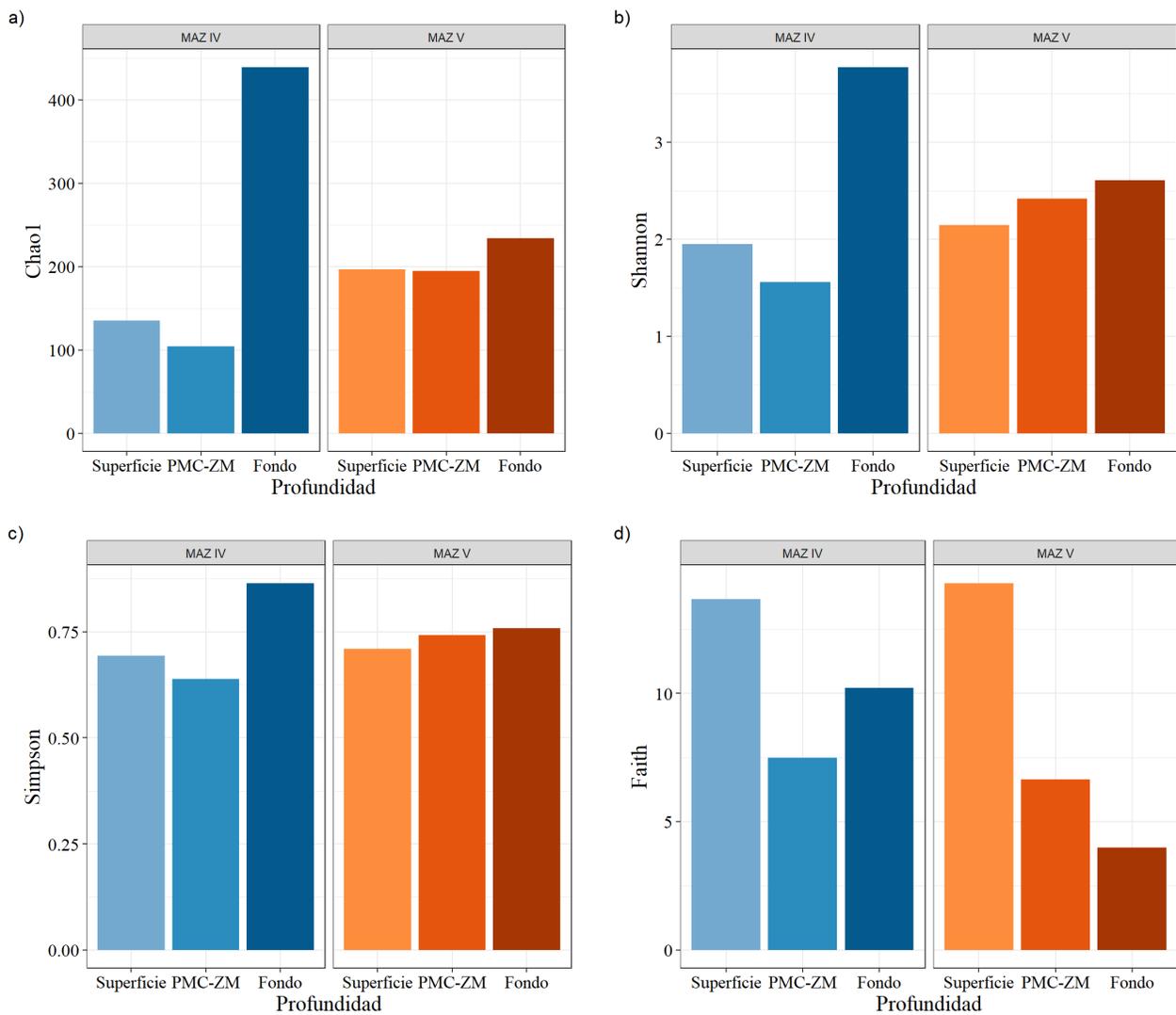


Figura S5. Comparación de la diversidad alfa de las muestras de la estación costera por profundidad en cada crucero para los diferentes índices calculados: a) índice de Chao1, b) índice de Shannon, c) índice de Simpson y d) índice de Faith. Las muestras se encuentran resaltadas por crucero (MAZ IV=Azul, MAZ V=Naranja) y ordenadas por profundidad (diferentes tonalidades de color). Abreviaturas: PMC: primer máximo de clorofila y ZM: zona mezclada.

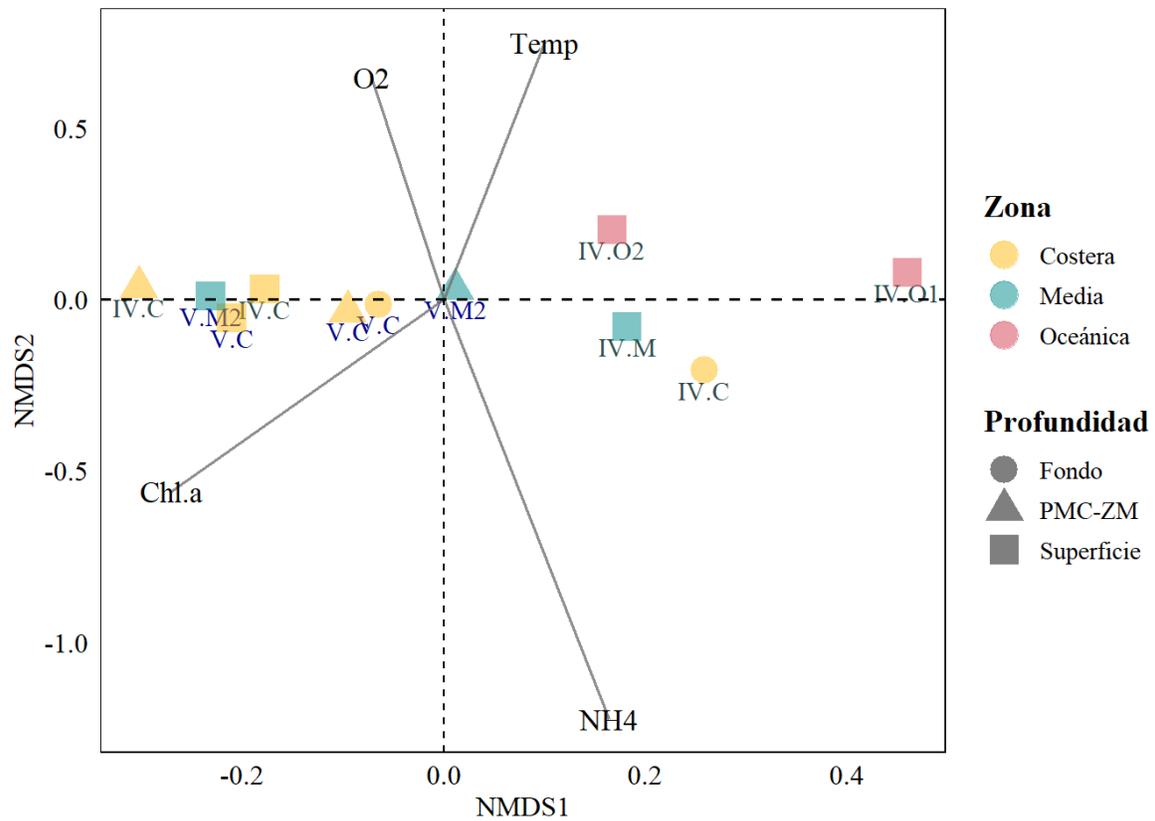


Figura S6. Gráfica NMDS basada en la matriz de distancia de Bray-Curtis de las once muestras (etiquetas), tres profundidades (símbolos) y tres diferentes zonas de muestreo (colores). Las propiedades ambientales se ajustaron a la gráfica NMDS. La única variable que mostró un valor significativo fue el NH_4^+ (valor de $P < 0.05$). Abreviaturas: PMC-ZM: primer máximo de clorofila o zona mezclada, NH_4 : amonio, O_2 : Oxígeno, Temp: Temperatura y Chl.a: Clorofila *a*; Etiquetas: IV o V = crucero MAZ IV o MAZ V; C = estación costera, M = estación media, O = estación oceánica.

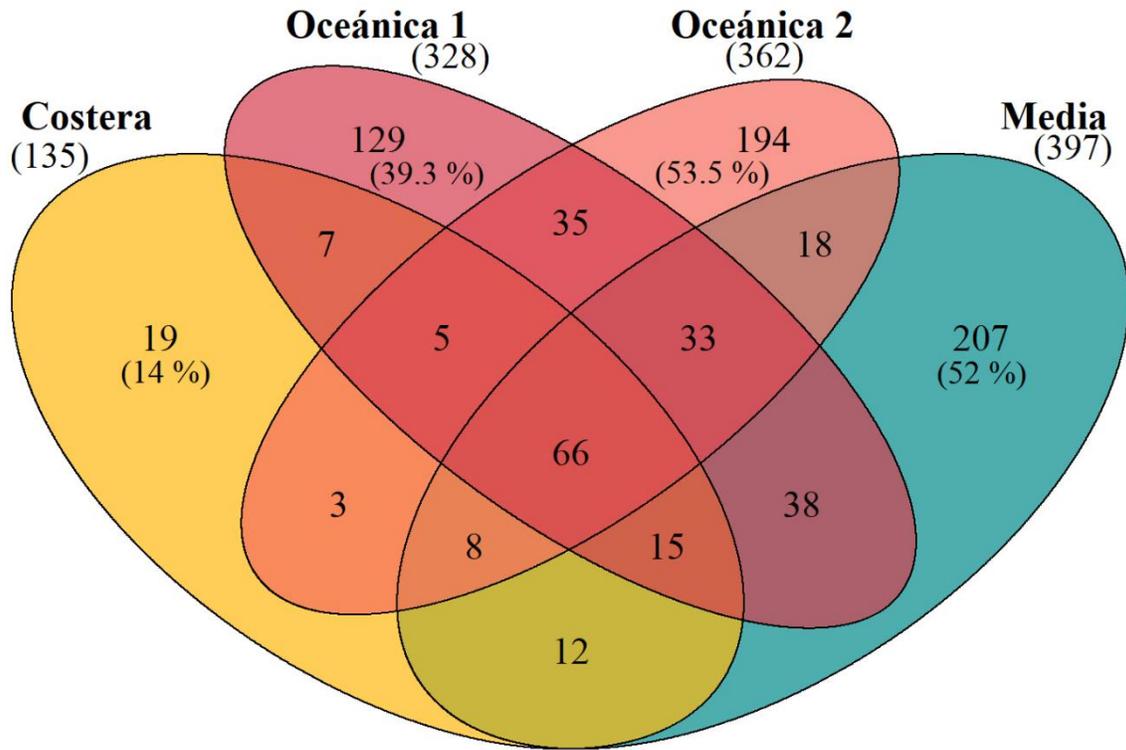


Figura S7. Diagrama de Venn-Euler de las ASVs compartidas entre las muestras superficiales de las estaciones de muestreo del crucero MAZ IV.

Tabla S1. Muestras amplificadas y secuenciadas de ambos cruceros

Crucero	Estación	Profundidad	Muestras amplificadas	Muestras secuenciadas
MAZ IV	Costera (EC)	Superficie	Si	•
		PMC	Si	•
		Fondo	Si	•
	Media (EM)	Superficie	Si	•
		PMC	No	
		Final Oxiclina		
		Fondo		
	Oceánica 1 (EO1)	Superficie	Si	•
		PMC	No	
		Final oxiclina		
		Núcleo ZMO		
		Fondo		
	Oceánica 2 (EO2)	Superficie	Si	•
		PMC	No	
		Final oxiclina		
Núcleo ZMO				
Fondo				
MAZ V	Costera (EC)	Superficie	Si	•
		Zona Mezclada	Si	•
		Fondo	Si	•
	Media (EM2)	Superficie	Si	•
		PMC	Si	•
		Final oxiclina	No	
		Fondo		
	Oceánica (EO2)	Superficie	Si	
		PMC	No	
		Final oxiclina		
Núcleo ZMO				
Fondo				

Abreviaturas: PMC: primer máximo de clorofila. Nota: En la última columna, se marca con un punto las muestras que fueron secuenciadas.

Tabla S2. Resultados de las pruebas ANOSIM

a) Prueba ANOSIM entre las muestras superficiales de ambos cruceros

R estadística: 0.1667; Significancia: 0.53333						
Número de permutaciones: 719						
Cuantiles superiores de las permutaciones (modelo nulo):						
	90%	95%	97.5%	99%		
	0.5	0.5	0.5	0.5		
Rangos de disimilitud entre y dentro de las clases:						
	0%	25%	50%	75%	100%	N
Entre estaciones	1	4.75	8	12.25	15	12
Costera	3	3.00	3	3.00	3	1
Media	10	10.00	10	10.00	10	1
Oceánica	8	8.00	8	8.00	8	1

b) Prueba ANOSIM entre los años de muestreo usando las muestras de la zona costera y la zona media

R estadística: 0.07292; Significancia: 0.2529						
Número de permutaciones: 9999						
Cuantiles superiores de las permutaciones (modelo nulo):						
	90%	95%	97.5%	99%		
	0.188	0.271	0.531	0.531		
Rangos de disimilitud entre y dentro de las clases:						
	0%	25%	50%	75%	100%	N
Entre cruceros	1	9.25	16.0	21.25	27	16
MAZ IV	5	17.00	22.0	25.50	28	6
MAZ V	2	5.00	8.5	11.25	13	6